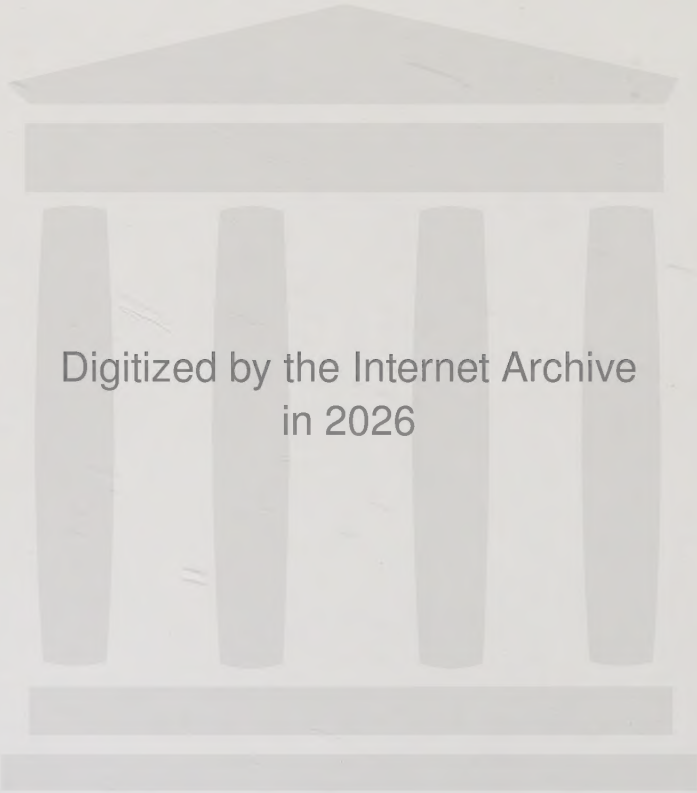


**Peptidsynthesen unter Verwendung
von β -Dicarbonylverbindungen
als Aminoschutzgruppen**

Fritz Zumstein

—

1965.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PEPTIDSYNTHESSEN UNTER VERWENDUNG VON
 β -DICARBONYLVERBINDUNGEN ALS AMINOSCHUTZGRUPPEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Fritz Zumstein
aus
München

1965



1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Dane
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Huisgen
- Tag der mündlichen Prüfung: **24. NOV. 1965**

MEINER FRAU

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1963 bis Mai 1965 im Institut für Organische Chemie der Universität München durchgeführt.

Meiner hochverehrten Lehrerin

Frau Professor Dr. Elisabeth D a n e

möchte ich für die immer gewährte Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit und für die stete Bereitschaft, auch in persönlichen Dingen mit Rat und Tat zu helfen, herzlich danken.

Herrn Professor Dr. R. H u i ' s g e n , dem Direktor des Instituts für Organische Chemie der Universität München, danke ich für die großzügige Förderung.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Diskussion der Versuchsergebnisse	1
Experimenteller Teil	15
1. L-Arginyl-glycin	15
1.1 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-arginin	15
1.2 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-arginyl-glycin	17
1.3 L-Arginyl-glycin	19
1.4 Umsetzungen von L-Arginin mit weiteren β -Dicarbonyl- verbindungen	19
2. Versuch zur Darstellung von 6-[L-Arginyl]-aminopenicillan- säure	23
3. L-Histidyl-glycin	24
3.1 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-histidin-kalium	24
3.2 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-histidyl-glycin	25
3.3 L-Histidyl-glycin	26
3.4 Umsetzungen von L-Histidin mit weiteren β -Dicarbonyl- verbindungen	27
4. L-Methionyl-glycin	28
4.1 N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-methionin-kalium	28
4.2 N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-methionyl-glycin- äthylester	28
4.3 N-[1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl]-L-methionin-kalium ..	29
4.4 N-[1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl]-L-methionyl- glycinäthylester	30
4.5 L-Methionyl-glycin	31
5. Umsetzung von N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-glutaminsäure- bis-kalium mit Glycinäthylester nach der Cyanmethylester- Methode	32
6. Abspaltung der Aminoschutzgruppe Benzoylacetone durch Amine	33
7. Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid	36

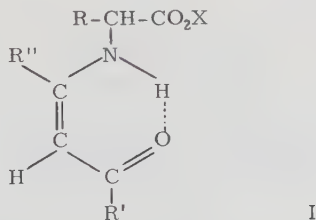
	Seite
8. Umsetzung von Glycinäthylester mit Phenylbrenztrauben- säure	38
8.1 Darstellung der Verbindung $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$	38
8.2 Überführung der Verbindung $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ in das Hydro- chlorid $C_{13}H_{17}NO_5 \cdot HCl$ und in die Verbindung $C_{13}H_{17}NO_5$	41
8.3 Reaktionen der Verbindung $C_{13}H_{17}NO_5$ mit Diazomethan und mit Benzoylchlorid	43
Literaturverzeichnis	45

Peptidsynthesen unter Verwendung von β -Dicarbonylverbindungen als Aminoschutzgruppen

Diskussion der Versuchsergebnisse

Bei der Synthese von Peptiden verwendet man Aminoschutzgruppen, die sich unter einfachen Reaktionsbedingungen einführen und — nach erfolgter Peptidsynthese — wieder schonend abspalten lassen. Die meistverwendete Methode zu dieser reversiblen Maskierung der Aminofunktion ist die Acylierung, vor allem die von Bergmann und Zervas (1) eingeführte Carbobenzyloxylierung. Allerdings ist der Anwendungsbereich dieser Methode begrenzt; die Abspaltung des als Schutzgruppe dienenden Benzyloxycarbonylrests — Hydrolyse in saurem Milieu oder katalytische Hydrierung — ist mit Schwierigkeiten verbunden, wenn höhere oder schwefelhaltige Peptide vorliegen. In diesen Fällen beobachtet man bei der Entfernung der Schutzgruppe gelegentlich eine Spaltung der Peptidbindung oder andere störende Nebenreaktionen.

Auf der Suche nach einer Schutzgruppe, die unter milden Bedingungen zu entfernen ist, setzte E. Dane (2) β -Dicarbonylverbindungen mit Aminosäuren um. Die von den Mitarbeitern P. Konrad (3), F. Drees (4) und T. Dockner (5) ausgeführten Arbeiten ergaben, daß sich die so erhaltenen N-geschützten Aminosäurederivate bei Peptidsynthesen erfolgreich einsetzen lassen. Es erwies sich als vorteilhaft, daß die Enamin-Derivate I unter milden Bedingungen, d.h. mit verdünnter Säure gespalten werden.



Nachdem E. Dane und Mitarbeiter (3-5) eine Reihe von bifunktionellen Aminosäuren mit Hilfe von β -Dicarbonylverbindungen in Peptidderivate überführt hatten, war es von Interesse, die Verwendungsfähigkeit dieser Schutzgruppen bei "mehrfunktionellen" Aminosäuren zu untersuchen.

L-Arginin-Derivate

Die sehr wichtige Einführung des Arginins in Peptide ist immer noch mit Schwierigkeiten verbunden. Außer der α -Aminogruppe muß auch die ω -Guanidinogruppe geschützt werden. Zur Blockierung dieses basischen Guanidinorests sind vornehmlich drei Methoden geeignet: die Nitrierung, die Acylierung oder die Salzbildung.

M. Bergmann und Mitarbeiter (6) haben gezeigt, daß das von A. Kossel und E.L. Kennaway (7) dargestellte $N\omega$ -Nitroarginin für die Synthese von Arginin-peptiden geeignet ist; die Nitrogruppe kann nach erfolgter Synthese durch katalytische Hydrierung abgespalten werden. Eine Reihe von Autoren haben auf diese Weise Arginin als "End"-aminosäure nach der Carbodiimid-, Azid- und "gemischten Anhydrid"-Methode in Peptide eingeführt (8; 9; 10; 11). Der Verwendung als "Kopf"-aminosäure standen Schwierigkeiten bei der Herstellung des Säurechlorids bzw. -hydrazids entgegen, die erst durch die Anwendung der "gemischten Anhydride" mit Alkylkohensäuren überwunden wurden (8, 10-13).

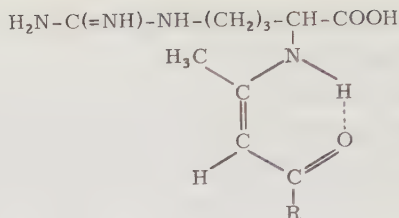
Als weitere Möglichkeit, die Guanidinogruppe zu schützen, wurden Acylgruppen eingeführt. Man stellte N_α , $N\omega$ -diacylierte Arginine her und zwar Dibenzoyl- (14), Diphenylsulfonyl- (15), Dibenzylsulfonyl- (16) und Di-p-nitrobenzyloxycarbonyl-arginin (17). Doch die Existenz von N_α , $N\omega$ -Dibenzoyl-arginin-hydrochlorid (14) zeigte, daß die Basizität der Guanidinogruppe keineswegs hinreichend unterdrückt war. Die von D.T. Gish und F.H. Carpenter ausgeführten pK-Messungen (18) bestätigten dies.

Einen entscheidenden Fortschritt brachte die Darstellung von N_α , $N\omega$, $N\omega$ -Tri-benzyloxycarbonyl-L-arginin (L. Zervas, 19). In dieser Verbindung ist die basische Wirkung der Guanidinogruppe soweit zurückgedrängt, daß sie als "Kopf"-aminosäure nach verschiedenen Synthesemethoden umgesetzt werden konnte (19, 20). Über dieses dreifach acylierte Derivat wurde — durch Behandlung mit methanolischer Kalilauge — N_α , $N\omega$ -Di-benzyloxycarbonyl-L-arginin zugänglich, das sich ebenfalls mit Aminosäureester-hydrochloriden (nach der Carbodiimid-Methode) in geschützte Peptidester überführen ließ. Bemerkenswerterweise verlief die Peptidverknüpfung besser, als die Aminosäureester-hydrochloride statt der Ester verwendet wurden. Diese Tatsache ist dadurch zu erklären, daß sich die Protonen des eingesetzten Ester-hydrochlorids vor der Peptidverknüpfung an das Dibenzylloxycarbonyl-arginin

anlagern. — Um von den oben angeführten drei- bzw. zweifach acylierten Argininderivaten zu geeignet geschützten "End"-aminosäuren zu gelangen, war es erforderlich, den Benzyloxycarbonylrest des α -ständigen Stickstoffatoms zu entfernen. Diese Abspaltung erfolgte durch Behandeln mit Thionylchlorid bzw. Phosphor(V)-chlorid und anschließende Hydrolyse der dabei gebildeten Anhydride. Auf diese Weise wurde N_{ω} , N_{ω} -Di-benzyloxycarbonyl-L-arginin und besonders N_{ω} -Benzyloxycarbonyl-L-arginin erhalten, dessen Benzylester — mit Tri-benzyloxycarbonyl-L-arginin umgesetzt — die Synthese von L-Arginyl-L-arginin ermöglichte (19, 20). Auch hier machte L. Zervas wieder die Beobachtung, daß die Anwesenheit eines Äquivalents einer starken Säure die Ausbeute und die Reinheit verbesserte.

Die einfachste Methode zur Maskierung der Guanidinogruppe ist deren Protonisierung. Dabei berücksichtigt man die Messungen von D.T. Gish und F.H. Carpenter, wonach der pK-Wert der Guanidinofunktion 12.5 beträgt, während der eines Aminosäureesters bei 8 liegt (18). Um eine wirksame Blockierung des Guanidinorests zu erreichen, ist ein pH-Wert einzuhalten, der die Anlagerung eines Protons an die Guanidinogruppe zuläßt, ohne daß die zu verknüpfende α -Aminogruppe protonisiert wird. In der Praxis hat sich der pH-Bereich von 10.5 bis 11.5 bewährt; als Protonendonatoren verwendet man dabei Brom- oder Chlorwasserstoff. Diese Methode zur Protonisierung der Guanidinogruppe ist für die synthetische Verwendung von Arginin als "Kopf"-komponente (18, 21-24) wie auch als "End"-komponente (8, 22) geeignet.

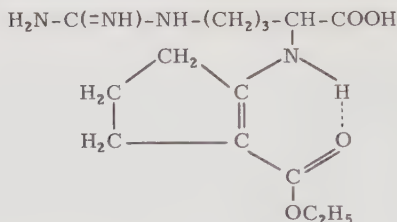
Es war von Interesse, zu untersuchen, ob durch Umsetzung von Arginin mit β -Dicarbonylverbindungen geeignete N-geschützte Derivate zu erhalten waren. Frühere Bearbeiter (3-5) haben durch β -Dicarbonylverbindungen N-geschützte Aminosäure-Derivate ausgehend von den Kaliumsalzen der Aminosäuren dargestellt. Als wir L-Arginin — ohne Zusatz von Kalilauge — mit Benzoylacetone (Molverhältnis 1:1) umsetzten, wurde eine Verbindung erhalten, die auf ein Mol der Aminosäure ein Mol der β -Dicarbonylverbindung enthielt. Auf Grund der basischen Guanidinogruppe schreiben wir dieser Verbindung die folgende Strukturformel IIa zu:



II

	R	Aminoschutzgruppe	Abkürzung
Ila	C ₆ H ₅	1-Methyl-2-benzoyl-vinyl	MBV
I Ib	CH ₃	1-Methyl-2-acetyl-vinyl	MAV
I Ic	OC ₂ H ₅	1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl	MAeV

Entsprechende Derivate wurden erhalten, als man L-Arginin mit Acetylaceton (I Ib), Acetessigsäureäthylester (I Ic) und mit Cyclopentanon(2)-carbonsäure(1)-äthylester (I Id) umsetzte.



I Id

I Id 2-Äthoxycarbonyl-cyclopenten(1)-yl AeCP

Die in Methanol suspendierte Aminosäure reagierte in ein bis drei Tagen bei Raumtemp. mit einer äquivalenten Menge der Dicarbonylverbindung. Die entstandenen geschützten Derivate (Ausbeuten: 77-90%) waren — obwohl dünn-schichtchromatographisch rein — mit Ausnahme des kristallin anfallenden AeCP-L-Arginins nur in glasig-amorpher Form zu erhalten. — Versuche, durch Umsetzung von L-Arginin-kalium mit einem Überschuß an Acetylaceton ein mehrfach geschütztes Derivat darzustellen (im Anschluß an 1.1 beschrieben), führten zu einer Substanz, die sich in ihren Eigenschaften — Löslichkeiten, RF-Wert und Zers.-P. — deutlich von MAV-L-Arginin unterschied. Die Analysenwerte des glasigen Produkts ermöglichten aber keine Identifizierung.

Die vier dargestellten N-geschützten L-Argininderivate zeigten bei ihrer Verwendung zu Peptidsynthesen recht unterschiedliche Eigenschaften. MBV-L-Arginin war in den für Peptidsynthesen geeigneten Lösungsmitteln so schwer löslich, daß keine Synthesereaktion zu beobachten war. Als wir AeCP-L-Arginin oder MAeV-L-Arginin mit Glycinäthylester nach der Pivaloylchlorid-Methode (25) unter den üblichen Bedingungen umsetzten, trat Umaminierung ein, d.h. die Schutzgruppe wanderte an den zugesetzten Aminosäureester, bevor Kondensation eintrat. Diese Ausweichreaktion hat schon T. Dockner (5) beobachtet, allerdings nur bei Synthesen nach der Carbodiimid-Methode (26) und nach der Chlorkohlensäureester-Methode (27). — Dagegen ließ sich MAV-L-Arginin erfolgreich zu einer Peptidsynthese einsetzen, da bei dieser Verbindung keine Umaminierung eintrat; auch hatte sie geeignete Löslichkeiten. Bei der Peptidverknüpfung arbeiteten wir nach der Pivaloylchlorid-Methode (25) unter Zusatz eines Äquivalents Triäthylammoniumchlorid. Das geschützte Peptidesterderivat wurde in wäßriger Lösung alkalisch verseift, wobei man darauf achtete, daß der pH-Wert 11.5 nicht überschritten wurde; unter diesen Bedingungen bleibt nach D.T. Gish (18) die Guanidinogruppe protonisiert. Die Ausbeute an MAV-L-Arginyl-glycin betrug 43%, bei einer Synthese ohne Zusatz von Triäthylammoniumchlorid 38%. Als wir nach der Carbodiimid-Methode arbeiteten, erhielten wir nur eine geringe Ausbeute an stark verunreinigtem MAV-L-Arginyl-glycin. R.A. Boissonnas und Mitarb. hatten ausgehend von Benzyloxycarbonyl-arginin-hydrobromid, nach der Carbodiimid-Methode in über 50proz. Ausbeute geschützte Dipeptidester erhalten (22).

Die Bedingungen zur Abspaltung der Schutzgruppe aus MAV-L-Arginyl-glycin waren recht milde: nach zweitägigem Stehen einer Lösung der Verbindung in 50proz. Eisessig bei Raumtemp. isolierte man in 76proz. Ausbeute L-Arginyl-glycin-diacetat. Bezogen auf die eingesetzte Menge an freiem Arginin errechnet sich über sämtliche Reaktionsschritte eine Ausbeute von 29% (L. Zervas und Mitarb. (20) etwa 16%). Der gemessene Drehwert zeigte, daß keine Racemisierung eingetreten war.

Da sich Acetylaceton als Schutzgruppe leicht mit Säure abspalten läßt und daher bei säureempfindlichen Verbindungen Vorteile hat, haben wir versucht, ob man mit Hilfe dieser Schutzgruppe die noch nicht beschriebene 6-[L-Arginyl]-aminopenicillansäure darstellen könne. T. Dockner (5) hatte unter Verwendung von β -Dicarbonylverbindungen als Aminoschutzgruppen 6-[D- α -Amino- α -phenylacetyl]-aminopenicillansäure (65%) synthetisiert. Wir setzten MAV-L-

Arginin mit dem Triäthylammoniumsalz der 6-Aminopenicillansäure in Dimethylformamid nach der Pivaloylchlorid-Methode um. Nur in einem von mehreren Ansätzen wurden Analysenwerte erhalten, die mit denen von 6-[MAV-L-Arginyl]-aminopenicillansäure-hydrochlorid übereinstimmten. Offenbar hatte nur teilweise Reaktion stattgefunden; auch nach wiederholten Versuchen der Synthese und der Reinigung war kein geschütztes Peptidderivat zu isolieren. Der geringe Grad der Umsetzung mag damit zusammenhängen, daß die Anwesenheit des Triäthylammoniumsalzes der Aminopenicillansäure die notwendige Protonisierung der Guanidinogruppe beeinträchtigt. Diese Überlegung wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß ein Versuch zur Synthese von MAV-L-Arginyl-glycin erfolglos verläuft, wenn man der Reaktion Triäthylamin zusetzt.

Bei Wiederholung dieser Synthesen wurde die Schutzgruppe — ohne das N-geschützte Peptidderivat zu isolieren — während der Aufarbeitung durch Ansäuern abgespalten. Da Versuche zur Auftrennung des erhaltenen Substanzgemisches meist eine Aufspaltung des labilen β -Lactamrings mit sich brachten, wurde das Rohprodukt mikrobiologisch untersucht. Es zeigte gegen E.coli und gegen B.Subtilis keine Wirksamkeit.

L-Histidin-Derivate

Die Einführung von Histidin als "Kopf"-aminosäure in Peptide ist mit Schwierigkeiten verbunden.

Auf Grund der Basizität des Imidazolrings haben Histidine, die an der α -Aminogruppe acyliert sind, noch merklich Eigenschaften von zwitterionischen Verbindungen und sind in organischen Lösungsmitteln schwer löslich.

A. Patchornik und Mitarb. (28) haben daher im-N, α -N-Dibenzoyloxycarbonyl-L-histidin dargestellt, das sowohl an der α -Aminofunktion als auch am Imidazolring acyliert war und das gute Löslichkeiten hatte. Diese Verbindung zersetzte sich — auch in reinem kristallinem Zustand — nach kurzer Zeit. Außerdem wanderte, wie bei acylierten Imidazolen üblich (29), der am Imidazolring befindliche Benzyloxycarbonylrest leicht an nukleophile Reagenzien wie Aminosäureester. Als Methoden zur reversiblen Maskierung der NH-Imidazolgruppierung verblieben die Benzylierung von V. du Vigneaud (30) und die Tri-tylierung von L. Zervas (31). Andere Möglichkeiten, Histidin als "Kopf"-

komponente in Peptide einzuführen, haben K. Okawa (33), H. Schwarz (39) und R.W. Holley (40) untersucht.

N-geschützte Derivate mit möglicherweise günstigen Lösungseigenschaften für die Peptidsynthese waren bei einer Umsetzung von L-Histidin mit β -Dicarbonylverbindungen zu erwarten. Vorversuche zeigten, daß diese Reaktion nur in Anwesenheit von Alkali erfolgreich verläuft. Zur Darstellung der N-geschützten Kaliumsalze wurde L-Histidin mit einem Äquivalent methanolischer Kalilauge und der β -Dicarbonylverbindung umgesetzt. Während der Umsetzung fiel die Aminosäure aus und ging beim Rühren erst nach ein bis acht Tagen unter Bildung des N-geschützten L-Histidinkaliumsalzes in Lösung. Wir setzten Acetylaceton, Benzoylaceton und Cyclopentanon(2)-carbonsäure(1)-äthylester mit L-Histidinkalium um.

Während die Versuche zur Darstellung von MBV- und AeCP-L-Histidinkalium keine für die Peptidsynthese geeigneten Derivate ergab, wurde in guter Reinheit MAV-L-Histidin-kalium (80%) erhalten. Bei einem Versuch, diese Verbindung nach S. Bäuerlein (32) mit Hilfe eines Ionenaustauschers in die Säure MAV-L-Histidin zu überführen, isolierten wir nur eine unreine Substanz. Anscheinend ist das zur Eluierung verwendete Dimethylformamid so polar, daß die N-geschützte Aminosäure autoprotolytisch in ihre Komponenten L-Histidin und Acetylaceton zerfällt.

Nachdem K. Okawa (33) ein am Imidazolring nicht geschütztes L-Histidinderivat bei einer Peptidsynthese nach der Carbodiimid-Methode (26) erfolgreich umgesetzt hatte, lag es nahe, das Verhalten von MAV-L-Histidin-kalium zu untersuchen. Obwohl Aminosäureester-hydrochlorid und Dicyclohexylcarbodiimid gleichzeitig zur N-geschützten Aminosäure zugefügt wurden, trat zum größten Teil Abspaltung der Schutzgruppe und Umaminierung ein; die Ausbeute an MAV-L-Histidylglycin betrug nach Verseifung und Aufarbeitung nur 9%. Die Schutzgruppe ließ sich durch ein Äquivalent 1n Salzsäure bei Raumtemp. abspalten. Der optische Drehwert des erhaltenen L-Histidyl-glycin-hydrochlorids lag höher als der in der Literatur (34) beschriebene.

L-Methionin-Derivate

T. Dockner (5) hat DL-Methionin mit Acetylaceton und mit Benzoylaceton zu N-geschützten Derivaten umgesetzt und diese in N-geschützte Dipeptidester überführt. Es interessierte uns, ob und wie weit bei Verwendung dieser Schutzgruppen Racemisierung eintritt. Wir setzten daher L-Methionin-kalium mit verschiedenen β -Dicarbonylverbindungen um. Bei Umsetzungen mit Benzoylaceton und mit Acetessigsäureäthylester wurden MBV- und MAeV-L-Methionin-kalium erhalten, die beide zur Peptidsynthese geeignet waren. Erwähnenswert ist die leichte Löslichkeit der durch Acetessigester geschützten Verbindung in Äther und Tetrahydrofuran. — Ein Versuch, Diacetylmonoxim mit L-Methionin zu einem N-geschützten Derivat umzusetzen, verlief erfolglos.

Die erhaltenen N-geschützten Salze, MBV- und MAeV-L-Methionin-kalium, ließen sich nach der Pivaloylchlorid-Methode mit Glycinäthylester zu den entsprechenden geschützten Dipeptidestern umsetzen (64% und 53%). Zur Darstellung des Dipeptids L-Methionyl-glycin verseifte man MAeV-L-Methionylglycinäthylester alkalisch, überführte das erhaltene MAeV-L-Methionylglycin-natrium mit Hilfe eines Ionenaustauschers in MAeV-L-Methionyl-glycin (Bäuerlein (32)) und entfernte die Schutzgruppe durch Ansäuern mit Eisessig. Das in guter Ausbeute erhaltene L-Methionyl-glycin hatte den in der Literatur (35) beschriebenen optischen Drehwert.

L-Glutaminsäure-Derivate

P. Konrad (3) hat MBV-L-Glutaminsäure-bis-kalium mit Glycinäthylester nach der Carbodiimid-Methode zum N-geschützten Tripeptidester umgesetzt. Uns interessierte, ob man dieses Derivat einer mehrfunktionellen Aminosäure auch unter den energischeren Bedingungen der Cyanmethylester-Methode (36) in den N-geschützten Peptidester überführen könne. Wir setzten MBV-L-Glutaminsäure-bis-kalium (3) mit Chloracetonitril um und erhielten den entsprechenden Cyanmethylester als ölige Substanz. Bei der Peptidverknüpfung mit Glycinäthylester erhielten wir das Umaminierungsprodukt MBV-Glycinäthylester und in ölicher Form MBV-L-Glutamyl-bis-glycinäthylester; der geschützte Peptidester konnte nur dünnschichtchromatographisch mit einer authentischen Probe von P. Konrad identifiziert werden.

Aminolytische Abspaltung von Benzoylacetone

β -Dicarbonylverbindungen, die als Aminoschutzgruppen an Peptide, Aminosäuren oder deren Salze gebunden sind, lassen sich, wie erwähnt, leicht durch verdünnte Mineralsäuren abspalten. Diese Methode hat Nachteile, wenn sich das erhaltene Peptid schlecht vom gleichzeitig gebildeten Mineralsäuresalz abtrennen läßt. Nachdem T. Dockner bei Peptidsynthesen Umaminierungen beobachtet hatte, benutzte er diese Reaktion zur Abspaltung von Aminoschutzgruppen: die Umsetzung von N-geschützten Aminosäuren und Peptiden mit primären Aminen — Methyl- und Butylamin — ergab in guten Ausbeuten die ungeschützten Verbindungen. In Fortführung dieser Versuche setzten wir MBV-Glycin mit Phenylhydrazin sowie mit Hydroxylamin um. Bei Versuchen in Methanol als Lösungsmittel war stets die gewünschte Abspaltung der Schutzgruppe zu beobachten. Als wir aber bei Umsetzungen von MBV-Glycin mit Phenylhydrazin weniger polare Lösungsmittel wie Toluol oder Chloroform verwendeten, isolierten wir eine Substanz, die nach der Analyse die Summenformel $C_{18}H_{21}N_3O_3$ hatte; das entsprach einer Verbindung aus Phenylhydrazin und MBV-Glycin im Molverhältnis 1:1. Ihre Reaktionen deuteten darauf hin, daß das Phenylhydrazoniumsalz des MBV-Glycins vorlag. Im IR-Spektrum dieser Verbindung finden sich eine Bande im Bereich der NH-Absorption bei 3000 cm^{-1} , eine Bande bei 1655 cm^{-1} (chel. Carbonyl), sowie starke Banden bei 1610 cm^{-1} , 1587 cm^{-1} (C=C-Doppelbindung) und 1527 cm^{-1} . Es war keine eindeutige Identifizierung möglich. Offenbar erfordert die aminolytische Abspaltung der Schutzgruppe die Anwesenheit einer geringen Menge an Protonen. Ihre Bildung aus der N-geschützten Aminosäure, d.h. die Dissoziation der Carboxylgruppe, wird durch polare Lösungsmittel begünstigt, durch unpolare erschwert. Im Falle des N-geschützten Aminosäureesters kann keine Dissoziation — und also auch keine Abspaltung der Schutzgruppe — eintreten: bei Versuchen, MBV-Glycinäthylester mit Phenylhydrazin umzusetzen, wurde der geschützte Ester unverändert zurückgewonnen.

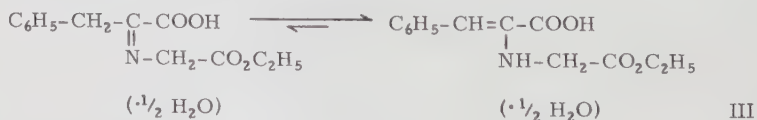
Beim Rühren in Methanol zerfiel die Verbindung $C_{18}H_{21}N_3O_3$, wie zu erwarten war, in Benzoylacetone-phenylhydrazon und Glycin.

Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid

W. Schröer (37) hat gefunden, daß Acetessigsäure-2-pyridylamid unter relativ milden Bedingungen zu verseifen ist. Dieser Befund veranlaßte uns, zu untersuchen, ob sich 2-Aminopyridin zur reversiblen Blockierung der Carboxylgruppe einer "End"-Aminosäure bei Peptidsynthesen eignete. Wir setzten MBV-Glycin nach der Pivaloylchlorid-Methode mit 2-Aminopyridin um und erhielten MBV-Glycin-2-pyridylamid. Dieses N-geschützte Glycinamid spaltete mit 2n Salzsäure — unter Bedingungen, die W. Schröer zur Verseifung von Acetessigsäure-2-pyridylamid angewandt hatte — lediglich Benzoylacetone ab und bildete Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid. Auch unter energischeren Bedingungen war keine Spaltung der Amidbindung zu beobachten. — Wesentlich leichter als Acetessigsäure-2-pyridylamid wird nach Beobachtungen von W. Schröer 1-Methyl-N-acetacetyl-pyridonimin-(2) verseift. Es bleibt zu untersuchen, wie sich 1-Methyl-N-glycyl-pyridonimin-(2) bei der sauren Verseifung verhält.

Umsetzung von Glycinäthylester mit Phenylbrenztraubensäure

Im Zusammenhang mit den Arbeiten, β -Dicarbonylverbindungen als Aminoschutzgruppen zu verwenden, interessierte auch das Verhalten von α -Ketosäuren gegenüber Aminosäuren. Als Modellreaktion wählten wir die Umsetzung von Phenylbrenztraubensäure mit Glycinäthylester. Die Komponenten reagierten (Ausbeute: 87%) zu einer Verbindung der Summenformel $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$. In mehreren Ansätzen zur Darstellung dieser Verbindung ergaben die Analysenwerte auch nach längerem Trocknen bei Raumtemp. stets die gleiche Summenformel $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$. Auf Grund dieser Summenformel ließen sich für die Verbindung unter verschiedenen Konstitutionsformeln vor allem folgende in Betracht ziehen: ein Azomethinderivat mit einem halben Mol Kristallwasser (oder ein Dimeres hiervon)

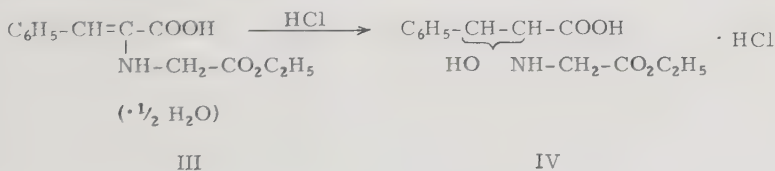


oder ein Kondensationsprodukt.

Die Verbindung $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ ergibt mit schwefelsaurer 2.4-Dinitrophenylhydrazinlösung nach einiger Zeit das 2.4-Dinitrophenylhydrazon der Phenylbrenztraubensäure. Mit Eisen(III)-chlorid tritt eine grüne Farbreaktion auf. Nach längerem Erhitzen einer wäßrigen Lösung der Substanz erhält man Phenylbrenztraubensäure.

Wegen der ungünstigen Löslichkeitseigenschaften war keine Molekulargewichtsbestimmung der Verbindung auszuführen; eindeutige Aussagen auf Grund des IR-Spektrums waren nicht möglich.

Um Aufschluß über die Verwendungsmöglichkeit von Phenylbrenztraubensäure als Aminoschutzgruppe zu erhalten, war es notwendig, die zur Entfernung der Schutzgruppe geeigneten Bedingungen zu untersuchen. Wir behandelten die Verbindung $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (III) bei Raumtemp. und in der Siedehitze mit 2n Salzsäure und isolierten durch Extraktion mit Äther in beiden Fällen Phenylbrenztraubensäure nur in einer Ausbeute von etwa 50%. In der wäßrigen Fraktion fand sich Glycinäthylester-hydrochlorid und ein Hydrochlorid der Zusammensetzung $C_{13}H_{17}NO_5 \cdot HCl$, das im Gegensatz zum Ausgangsprodukt mit Eisen(III)-chlorid keine Farbreaktion ergab. Dieser Befund deutete darauf hin, daß die Verbindung $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (III) unter innermolekularer Disproportionierung in ein Hydroxy-aminosäurederivat (IV) übergegangen war. Wir können auf Grund der durchgeführten Reaktionen nicht entscheiden, ob sich der Glycinäthylester-Rest am α - oder β -ständigen C-Atom befindet. Andere Möglichkeiten wurden nicht diskutiert, da die weiter unten angeführten Reaktionen diese unwahrscheinlich machten.



Mit Lauge ließ sich das Hydrochlorid $C_{13}H_{17}NO_5 \cdot HCl$ (IV) in die Verbindung $C_{13}H_{17}NO_5$ (90%) überführen, die ebenfalls keine Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid zeigte. Auch von dieser Verbindung ließ sich — da sie ungünstige Löslichkeitseigenschaften hatte — keine Molekulargewichtsbestimmung durchführen. Aus einem IR-Spektrum waren keine eindeutigen Aussagen über die Konstitution der Verbindung zu entnehmen; im Bereich der NH- und OH-Ab-

sorption finden sich zwei schwache Banden bei 3400 cm^{-1} und 3270 cm^{-1} . Bei der Einwirkung von Diazomethan auf die Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ bildete sich der entsprechende Methylester $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5$, wie die Summenformel und der gefundene Alkoxywert zeigten. In einem Versuch, die Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ zu benzoylieren unter Bedingungen, die bei der Acylierung von Hydroxylgruppen in Aminosäuren üblich sind (43), wurde die Verbindung $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ gebildet, die nur eine Benzoylgruppe enthielt. Die zur Hydrolyse der Acylgruppe angewandten Bedingungen (50proz. methanolische 1n Natronlauge) deuten darauf hin, daß die Benzoylgruppe an O gebunden vorliegt.

Das Benzoylderivat $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ hatte Löslichkeitseigenschaften, die eine Molekulargewichtsbestimmung erlaubten; danach hatte die Verbindung die angegebene Summenformel und war nicht dimer. Dieser Befund erlaubte allerdings keine Aussage über das Molekulargewicht der Vorstufe $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (III). Weder bei dem Benzoylderivat $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ noch bei dem oben angeführten Methylester $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ waren auf Grund von IR-Spektren eindeutige Aussagen über die Konstitution möglich.

Um einen Vergleich für das beobachtete Reaktionsverhalten des Azomethinderivats $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (III) gegenüber Salzsäure zu erhalten, setzten wir Phenylbrenztraubensäure mit Cyclohexylamin um (H. Pesenecker, 44) und behandelten die erhaltene Verbindung $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ mit Salzsäure (im Anschluß an 8.1 beschrieben); sie bildete kein IV analoges Derivat, sondern zerfiel quantitativ in ihre Komponenten.

Zusammenfassung

In Fortführung der Arbeiten von P. Konrad, F. Drees und T. Dockner über die Verwendung von β -Dicarbonylverbindungen als Aminoschutzgruppen bei Peptidsynthesen wurden Schutzgruppen gesucht, die für multifunktionelle Aminosäuren geeignet sind. Es zeigte sich, daß L-Arginin mit β -Dicarbonylverbindungen zu einfach N-geschützten Derivaten reagiert. Bei der Peptidsynthese von L-Arginylglycin bewährte sich nur das durch Acetylaceton N-geschützte L-Arginin. L-Histidin setzte sich mit β -Dicarbonylverbindungen zu ebenfalls einfach N-geschützten Derivaten um, deren Schutzgruppen allerdings sehr leicht unter den Bedingungen der Peptidsynthese abgespalten wurden. Nur das durch Acetylaceton N-geschützte L-Histidin ließ sich in etwa 10proz. Ausbeute in L-Histidylglycin überführen. Bei der Darstellung von L-Methionylglycin bewährten sich zur Maskierung der Aminofunktion Benzoylaceton und Acetessigsäureäthylester. Die Schutzgruppen der dargestellten N-geschützten Dipeptide wurden durch verdünnte Säuren abgespalten. Die optischen Drehwerte der erhaltenen Dipeptide stimmten mit den in der Literatur beschriebenen überein.

Um die Verwendungsmöglichkeit von α -Ketosäuren als Aminoschutzgruppen bei Peptidsynthesen zu untersuchen, setzten wir in einer Modellreaktion Phenylbrenztraubensäure mit Glycinäthylester um. Die dabei erhaltene Verbindung wurde bei Einwirkung von Salzsäure offenbar in ein Hydroxyamino-säurederivat überführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Ausgangssubstanzen: MBV-Glycin- und MBV-L-Glutaminsäure-Derivate wurden nach P. Konrad (3), MBV-Glycinäthylester nach T. Dockner (5) dargestellt. Die freie Aminosäure L-Histidin (45) erhält man wie freies Arginin (20) aus dem Hydrochlorid durch Zugabe von Lithiumhydroxyd. Das bei Peptidverknüpfungen verwendete Pivaloylchlorid wurde aus Pivalinsäure und Thionylchlorid bereitet. Die Darstellung des als Vergleichssubstanz verwendeten Benzoylacetophenylhydrazons erfolgte nach K. v. Auwers (46).

Lösungsmittel wurden über basischem Aluminiumoxyd (Akt.-St. I; Woelm) getrocknet, Tetrahydrofuran über Natrium. — Bei den Aufarbeitungen wurden die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer im Wasserstrahl-Vak., Wasser und Dimethylformamid im Ölpumpen-Vak. abgezogen. — Schmelzpunkte wurden im Schmelzpunktsblock bestimmt und sind nicht korrigiert. — Die Reinheit der Verbindungen wurde meist im Dünnschichtchromatogramm (auf Silicagel G, Merck) kontrolliert.

Indikatoren: Ninhydrin, Eisen(III)-chlorid und Jod. — Eisen(III)-chloridreaktionen in Äthanol oder Äthanol/Wasser. — Analysenpräparate wurden im Ölpumpenvak. über P_4O_{10} , wenn nicht anders angegeben, 48 bis 76 Stdn. bei Raumtemp. getrocknet. — Die Kaliumsalze wurden mit WO_3 -Zuschlag verbrannt. — Die optischen Drehwerte wurden mit dem lichtelektrischen Polarisometer der Firma Zeiss (LEP-A2) gemessen.

1. L-Arginyl-glycin

1.1 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-arginin

Eine Suspension von 1.85 g (10.6 mMol) L-Arginin in 10 ccm Äthanol (99proz.), die man mit 1.06 g (10.6 mMol) Acetylaceton versetzt hatte, wurde während 7 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Man filtrierte die trübe, farblose Lösung. Nach Abziehen des Lösungsmittels verblieb ein farbloser, glasartiger Rückstand. Die nach Verreiben mit Äther als farbloses Pulver erhaltene Substanz (2.42 g; 90%) war, wie ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1) zeigte, durch Spuren von Arginin verunreinigt.

Die Substanz ist leicht löslich in Methanol, Äthanol, Dimethylformamid und in Dimethylsulfoxyd, schwer löslich in anderen gebräuchlichen Lösungsmitteln. Ihre wäßrige Lösung zeigt einen pH-Wert von 7.5. Die Substanz gibt in alkoholischer Lösung mit Eisen(III)-chlorid eine kräftig blaue Farbreaktion, die langsam nach Rot übergeht.

Da die Substanz nicht gereinigt werden konnte (der Schmp. zog unter Gasen und Zersetzung von 100–180°) wurde sie als Rohprodukt umgesetzt (vgl. 1.2) und dadurch als MAV-L-Arginin identifiziert.

3.800 mg Substanz, 7.157 mg CO₂, 2.790 mg H₂O
2.887 mg Substanz, 0.557 ccm N₂, (25°, 706 Torr)

C₁₁H₂₀N₄O₃ (256.3)

Ber. C 51.56 H 7.86 N 21.88

Gef. C 51.40 H 8.21 N 20.53

Bei der Umsetzung von zwei Äquivalenten Acetylaceton mit einem Äquivalent L-Arginin in Methanol ergab sich eine Ausbeute von 93%. Als man L-Argininhydrochlorid mit Acetylaceton-kalium in Methanol umsetzte, erhielt man ein durch Kaliumchlorid verunreinigtes Produkt (90%). Es wurde durch ein Dünnschichtchromatogramm in Äthanol (99proz.) identifiziert.

Es wurde versucht, ein mehrfach geschütztes Derivat darzustellen: man versetzte eine Lösung von 0.32 g (1.27 mMol) MAV-L-Arginin in 4 ccm Methanol mit 0.5 ccm 2.53n methanolischer Kalilauge (1.27 mMol) und 1.00 g (9.99 mMol) Acetylaceton und ließ 3 Wochen bei Raumtemp. stehen. Nach Einengen der blaßgelben Lösung verblieb ein gelbes Öl, das sich beim Verreiben mit Äther zu einem glasartigen Produkt verfestigte (0.23 g). Man fällte aus Essigester/Petroläther um und erhielt 0.20 g eines farblosen Pulvers vom Zers.-P. 115–120°. Die Substanz war, wie ein Dünnschichtchromatogramm (Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) zeigte, frei von Ausgangssubstanzen. Sie löste sich in Wasser, Methanol, Äthanol, Essigester und Chloroform leicht, in Äther mäßig. Mit Eisen(III)-chlorid trat eine kräftig blaue Farbreaktion auf. Der Zers.-P. stieg nach dem Trocknen auf 126–131°. Eine Identifizierung auf Grund der Analysenwerte (Gef. C 53.99; H 7.54; N 14.31) war nicht möglich.

1.2 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-arginyl-glycin

Man versetzte eine Lösung von 0.60 g (2.34 mMol) MAV-L.-Arginin (dargestellt nach 1.1) in 10 ccm Dimethylformamid mit 0.32 g (2.34 mMol) Triäthylamin-hydrochlorid und rührte 2 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach Zugabe einer vorgekühlten Lösung von 0.28 g (2.34 mMol) Pivaloylchlorid in Dimethylformamid bei -14° rührte man noch 60 Min. bei dieser Temperatur. Die farblose Suspension wurde mit einer vorgekühlten Lösung von 0.24 g (2.34 mMol) Glycinäthylester in Dimethylformamid versetzt, unter Rühren während 2 Stdn. auf 4° erwärmt und bei dieser Temperatur 12 Stdn. belassen. Nachdem man von Triäthylamin-hydrochlorid (75%) abfiltriert hatte, engte man ein und behandelte den erhaltenen blaßgelben, öligen Rückstand dreimal mit je 7 ccm Äther. Ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Wasser) zeigte, daß neben wenig N-geschütztem Arginin eine reine, neue Verbindung vorlag.

Zu der Lösung des öligen Produkts (1.22 g) in 12 ccm Wasser tropfte man unter Rühren während 3 Stdn. 10.40 ccm 0.5n Natronlauge (5.20 mVal) so hinzu, daß der pH-Wert 11.5 (pH-Meter) nicht überschritten wurde. Die erhaltene bräunliche Lösung verblieb 2 Tage bei 4° und hatte dann einen pH-Wert von 11.0. Man versetzte mit 2 ccm Äthanol (99proz.) und dann tropfenweise mit Eisessig, bis pH 8 erreicht war. Die dabei ausfallenden farblosen, feinen Blättchen (0.17 g) hatten einen Zers.-P. von $157-181^{\circ}$. Mit den aus der Mutterlauge nach Einengen langsam nachfallenden Anteilen betrug die Ausbeute 0.32 g (43%).

Die hygroskopische Verbindung ist leicht löslich in Methanol und Eisessig, in der Hitze auch in Wasser und in Äthanol; sie ist schwer löslich in Äther und in Essigester. Mit Eisen(III)-chlorid gibt sie zunächst keine, nach einigen Min. eine weinrote Färbung.

Nach mehrmaligem, vorsichtigem Umkristallisieren aus Wasser und Behandeln mit Äther lag der Zers.-P. bei $195-205^{\circ}$. Zur Analyse wurde im HV bei 90° während 48 Stdn. über P_4O_{10} getrocknet.

4.450 mg Substanz, 8.090 mg CO_2 , 3.050 mg H_2O
3.315 mg Substanz, 0.674 ccm N_2 , (24° , 716 Torr)

$C_{13}H_{23}N_5O_4$ (313.4)

Ber. C 49.83 H 7.38 N 22.35

Gef. C 49.61 H 7.67 N 22.01

Die Substanz war dünnschichtchromatographisch rein (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1).

Die Ausführung der beschriebenen Peptid-Synthese nach der Pivaloylchlorid-Methode gelang in Abwesenheit von Triäthylamin-hydrochlorid in Dimethylformamid als Lösungsmittel (38 %), dagegen nicht in Tetrahydrofuran mit wenig Dimethylformamid als Lösungsvermittler.

Ein Versuch, MAV-L-Arginyl-glycin nach der Carbodiimid-Methode darzustellen, ergab nur ein unreines Produkt:

Man versetzte eine Lösung von 0.62 g (2.42 mMol) MAV-L-Arginin in 5 ccm Dimethylformamid bei 0° mit 0.34 g (2.42 mMol) Glycinäthylester-hydrochlorid, rührte 5 Min. und gab zu der dann klaren, farblosen Lösung 0.50 g (2.42 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stde. bei 0° begann ein farbloser Niederschlag auszufallen, der sich bei weiterem Rühren (2 Stdn.) vermehrte. Das Reaktionsgemisch stand 12 Stdn. bei 4° und enthielt, wie ein Dünnschichtchromatogramm zeigte (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1), neben viel Ausgangssubstanzen ein neues Produkt. Der nach Filtrieren, Waschen und Trocknen erhaltene farblose Rückstand (0.49 g) enthielt hauptsächlich MAV-L-Arginin-hydrochlorid. Die mit den Waschwässern vereinigte Mutterlauge hinterließ nach Abziehen des Lösungsmittels 1.13 g eines blaßgelben, öligen Kristallisats, das intensiven Geruch nach Carbodiimid hatte. Zur Verseifung des möglicherweise entstandenen Dipeptid-Esters rührte man in 10 ccm Wasser (10 Min. bei Raumtemp.) und saugte von wenig Unge-löstem ab. Aus dem klaren, wäßrigen Filtrat (pH 7.5) fiel bei Zugabe von 0.5n Natronlauge bis auf pH 11.5 eine geringe Menge Dicyclohexyl-harnstoff aus, den man abtrennte. Zu der Lösung wurden während 3 Stdn. unter Rühren 4.11 ccm 0.5n Natronlauge (2.05 mVal) so zugetropft, daß der pH-Wert nie höher als 11.5 lag. Man ließ die blaßgelbe Lösung 12 Stdn. bei 4° stehen und versetzte mit Eisessig, bis pH 8 erreicht war (0.02 ccm). Nach Abziehen des Lösungsmittels und Trocknen wurden 0.50 g eines gelben Kristallisats erhalten, das noch Carbodiimid enthielt. Ein Dünnschichtchromatogramm (Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) zeigte, daß durch Dicyclohexyl-harnstoff stark verunreinigtes MAV-L-Arginyl-glycin vorlag.

1.3 L-Arginyl-glycin

Man löste 0.94 g (3.00 mMol) des nach 1.2 dargestellten N-geschützten L-Arginyl-glycins in 4 ccm 50proz. Eisessig und ließ während 48 Std. bei Raumtemp. stehen. Nach Eindunsten der Lösung hinterblieb ein farbloses Öl, das bei Verreiben mit Äther kristallisierte (0.80 g; 76%). Mehrmals aus Eisessig/Essigester umkristallisiert, schmolz die feinkristalline Substanz bei 159-163°. Sie wurde während 24 Std. im HV über KOH bei 80° getrocknet, dabei stieg der Schmp. auf 163-168° (Lit. (10): 167-169°). Wie ein Dünnschichtchromatogramm in Methanol/Wasser (4:1) zeigte, war die Verbindung rein.

3.212 mg Substanz, 4.838 mg CO₂, 2.160 mg H₂O

2.831 mg Substanz, 0.509 ccm N₂, (25°, 721 Torr)

C₈H₁₇N₅O₃ · 2 CH₃COOH (351.4)

Ber. C 41.02 H 7.17 N 19.93

Gef. C 41.10 H 7.52 N 19.54

$$[\alpha]_D^{23} = +38.1^\circ \quad (c=1; \text{H}_2\text{O})$$

In der Literatur sind verschiedene Werte für die optische Drehung von L-Arginyl-glycin-diacetat angegeben.

K. Hofmann u. Mitarb. (10):

$$[\alpha]_D^{28} = +38.9^\circ \quad (c=5.75; \text{H}_2\text{O})$$

C. Berse u. L. Piché (13):

$$[\alpha]_D^{22} = +47.1^\circ \quad (c=0.89; \text{H}_2\text{O})$$

L. Zervas u. Mitarb. (20):

$$\left. \begin{array}{l} [\alpha]_D^{24-25} = +37.6^\circ \\ [\alpha]_D^{28} = +38.9^\circ \\ [\alpha]_D^{22} = +47.1^\circ \end{array} \right\} (c=1; \text{H}_2\text{O})$$

1.4 Umsetzungen von L-Arginin mit weiteren β-Dicarbonylverbindungen

1.4a) mit Benzoylacetone

Eine siedende Lösung von 0.31 g (1.40 mMol) Benzoylacetone-kalium in 10 ccm Methanol wurde in der Hitze mit einer Suspension von 0.30 g (1.42 mMol) L-Arginin-hydrochlorid in heißem Methanol versetzt. Nachdem das farblose

Reaktionsgemisch 6 Min. zum Sieden erhitzt worden war, hatte sich eine gelbe Lösung gebildet, aus der beim Abkühlen eine farblose Kristallmasse ausfiel. Man ließ das Reaktionsgemisch 3 Tage bei Raumtemp. stehen und erhielt 0.34 g (77 %) Substanz vom Zers.-P. 200-230°. Nach Eindunsten der Mutterlauge wurde der Rückstand mit Wasser behandelt, wobei als unlöslicher Anteil noch etwas Reaktionsprodukt zurückblieb. Das farblose Kristallpulver wurde zur Analyse mehrmals aus Äthanol/Wasser umkristallisiert; der Zers.-P. stieg auf 270-272°.

Die Verbindung ist nur in heißem Methanol/Wasser und in Äthanol/Wasser löslich; in den übrigen gebräuchlichen Lösungsmitteln ist sie schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid tritt in wäßrig-alkoholischer Lösung eine tiefblaue Farbreaktion auf, die beim Stehen oder auf Zusatz weniger Tropfen Säure nach Rot umschlägt.

3.441 mg Substanz, 7.526 mg CO₂, 2.120 mg H₂O
2.746 mg Substanz, 0.440 ccm N₂, (25°, 722 Torr)

C₁₆H₂₂N₄O₃ (318.4)

Ber. C 60.36 H 6.97 N 17.60

Gef. C 59.69 H 6.89 N 17.44

MBV-L-Arginin ließ sich auch, wie folgt, darstellen: man versetzte eine Suspension von 0.30 g (1.42 mMol) L-Arginin in 5 ccm Methanol mit 0.23 g (1.45 mMol) Benzoylacetone und rührte 2 Tage bei Raumtemperatur. Das nach Filtrieren und Waschen erhaltene farblose Pulver (0.40 g) suspendierte man in 10 ccm Wasser (pH 9.5), um freies Arginin abzutrennen. Die gereinigte Substanz (0.35 g; 77 %) zersetzte sich ab 230°. Sie war dünnschichtchromatographisch rein (Laufmittel: Methanol/Wasser 1:2).

Versuche, MBV-L-Arginin mit Glycinäthylester-hydrochlorid nach der Carbo-diimid-Methode in Chloroform, Dioxan/Wasser (1:1) oder in Pyridin umzusetzen, verliefen erfolglos, da die Verbindung in diesen Lösungsmitteln zu schwer löslich ist.

1.4b) mit Cyclopentanon(2)-carbonsäure(1)-äthylester

Eine Suspension von 1.03 g (5.92 mMol) L-Arginin in einer Lösung von 0.92 g (5.92 mMol) Cyclopentanon(2)-carbonsäure(1)-äthylester in 5 ccm Methanol stand während 76 Std. bei Raumtemperatur. Dabei hatte sich ein blaßgelber

Kristallkuchen gebildet. Die nach Absaugen und Waschen erhaltenen farblosen, filzigen Nadeln (1.52 g; 82 %) zersetzten sich bei 220–236°.

Zur Analyse wurde die Substanz mit heißem Äthanol und mit heißem Wasser behandelt, wobei der Zers.-P. auf 236–239° stieg. Ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1) zeigte eine neue Substanz, die durch wenig Arginin verunreinigt war.

Die Verbindung ist in heißem Wasser löslich. In den übrigen gebräuchlichen Lösungsmitteln ist sie schwer löslich. In Äthanol/Wasser gelöst, gibt sie mit einem Tropfen Eisen(III)-chloridlösung eine blaue Farbreaktion, die bei Zugabe von mehr Eisen(III)-chlorid in Grün übergeht.

4.186 mg Substanz, 8.251 mg CO₂, 2.990 mg H₂O
3.631 mg Substanz, 0.600 ccm N₂, (25°, 724 Torr)

C₁₄H₂₄N₄O₄ (312.4)

Ber. C 53.83 H 7.75 N 17.94

Gef. C 53.79 H 7.99 N 18.03

In Versuchen, AeCP-L-Arginin mit Glycinäthylester nach der Pivaloylchlorid-Methode zum Peptidester umzusetzen, trat Abspaltung der Schutzgruppe und Umaminierung ein:

Man versetzte eine Suspension von 1.06 g (3.39 mMol) AeCP-L-Arginin in 50 ccm Dimethylformamid mit 8 Tropfen Triäthylamin und kühlte auf –18°. Nach Zugabe einer vorgekühlten Lösung von 0.41 g (3.39 mMol) Pivaloylchlorid in 5 ccm Dimethylformamid rührte man 1 Stde. zur Bildung des gemischten Anhydrids, wobei nur teilweise Auflösung zu beobachten war. Man ließ sodann eine vorgekühlte Lösung von 0.35 g (3.39 mMol) Glycinäthylester in Dimethylformamid während 45 Min. zutropfen. Dabei stieg die Temp. auf –5°. Anschließend rührte man die gelbe Suspension 14 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach Absaugen, Waschen und Trocknen des farblosen Niederschlags erhielt man 0.22 g (21 %) AeCP-L-Arginin, identifiziert durch ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1) und die blaue Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid.

Die Mutterlauge enthielt, wie ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1) zeigte, Glycinäthylester und AeCP-L-Arginin, sowie das Umaminierungsprodukt AeCP-Glycinäthylester. Man engte ein und eluierte mit Äther aus dem öligen Kristallisat 0.08 g (10 %) AeCP-Glycinäthylester.

Zur Isolierung eventuell entstandenen N-geschützten Dipeptids wurde der nach der Ätherbehandlung verbliebene Rückstand nach 1.2 mit 0.5n Natronlauge versetzt und aufgearbeitet. Dabei isolierte man kein neues Produkt.

Auch bei einem Versuch, eine Peptidsynthese nach 1.2 unter Zusatz einer äquivalenten Menge Triäthylamin-hydrochlorids durchzuführen, trat Umaminierung ein.

1.4c) mit Acetessigsäureäthylester

Man versetzte eine Lösung von 0.48 g (3.68 mMol) Acetessigsäureäthylester in 8 ccm Methanol mit 0.32 g (1.84 mMol) L-Arginin und rührte während 7 Std. bei Raumtemperatur. Nach Filtrieren der trüben, farblosen Lösung und nach Abziehen des Lösungsmittels hinterblieb eine farblose, glasartige Substanz, die nach Verreiben mit 10 ccm Äther 0.43 g wog (82%). Sie zer setzte sich zwischen 150 und 200°.

Das Reaktionsprodukt hatte ähnliche Löslichkeiten wie MAV-L-Arginin, war aber in Äthanol und in Wasser schwerer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid gab das durch Acetessigester N-geschützte Arginin eine hellblaue Farbreaktion, die schnell in Rot überging. Als man eine wäßrige Suspension der Verbindung erhitzte, zerfiel sie, und der pH-Wert der Lösung stieg von 7.5 auf 12. Im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1 oder Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) ergab die Substanz einen lang gezogenen Flecken, in dem sich Arginin auf der ganzen Länge durch Ninhydrin nachweisen ließ.

In einem Versuch, die Substanz mit Glycinäthylester nach der Pivaloylchlorid-Methode zum Peptidester umzusetzen, trat Abspaltung der Schutzgruppe und Umaminierung ein:

Ausgehend von 0.41 g (1.43 mMol) MAeV-L-Arginin führte man eine Peptidsynthese nach 1.2 durch. Der dabei anfallende unlösliche Teil des Reaktionsgemisches (0.39 g) enthielt neben Triäthylamin-hydrochlorid auch Arginin, wie in einem Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) zu erkennen war. Nachdem die Mutterlauge analog 1.2 aufgearbeitet worden war, trennte man mit Äther 0.20 g (65%) MAeV-Glycinäthylester ab. Es wurde kein neues Produkt isoliert.

Bei einem Versuch in Abwesenheit von Triäthylamin-hydrochlorid trat ebenfalls Umaminierung ein.

2. Versuch zur Darstellung von 6-(L-Arginyl)-aminopenicillansäure

Eine Lösung von 1.20 g (4.69 mMol) MAV-L-Arginin in 20 ccm Dimethylformamid wurde mit 0.29 g (2.11 mMol) Triäthylamin-hydrochlorid versetzt und 30 Min. bei Raumtemp. gerührt. Man fügte zu der farblosen, trüben Lösung bei -17° eine vorgekühlte Lösung von 0.57 g (4.69 mMol) Pivaloylchlorid in Dimethylformamid und rührte 50 Min. bei -14° . Nach Zugabe einer vorgekühlten Lösung von 1.12 g (5.18 mMol) 6-Aminopenicillansäure und 0.71 g (7.01 mMol) Triäthylamin in 15 ccm Dimethylformamid ließ man die Temperatur der blaßgelben, trüben Lösung während 2 Stdn. auf 0° ansteigen. Nachdem das Reaktionsgemisch 12 Stdn. bei 4° gestanden war, trennte man von 0.62 g (4.51 mMol) Triäthylamin-hydrochlorid ab und engte das Filtrat ein. Das verbliebene gelbe Öl wurde zweimal mit je 25 ccm Äther behandelt und getrocknet. Das dabei erhaltene blaßgelbe Pulver (3.09 g) war, wie Dünnschichtchromatogramme (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1 und Ameisensäure/Wasser/t-Butanol 15:15:70) zeigten, nicht einheitlich; neben einer neuen Substanz waren in gleicher Konzentration Aminopenicillansäure, geschütztes Arginin und Triäthylamin-hydrochlorid zu erkennen. Wiederholte Versuche, aus diesem Gemisch durch Lösen in Methanol und Ausfällen mit Äther das N-geschützte Dipeptid-derivat zu isolieren, führten nur in einem Falle zu einer reinen Substanz (Dünnschichtchromatogramm in Ameisensäure/Wasser/t-Butanol 15:15:70). Der Zers.-P. lag bei 195° ; mit Eisen(III)-chlorid trat erst nach einiger Zeit intensive Rotfärbung auf.

2.740 mg Substanz, 4.630 mg CO_2 , 1.610 mg H_2O

2.956 mg Substanz, 0.472 ccm N_2 , (26° , 710 Torr)

$\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{ClN}_6\text{O}_5\text{S}$ (490.5)

Ber. C 46.51 H 6.32 N 17.13

Gef. C 46.11 H 6.57 N 17.03

Nach der oben beschriebenen Methode führte man weitere Ansätze durch und setzte das erhaltene Substanzengemisch zur Abspaltung der Schutzgruppe ein, ohne 6-(MAV-L-Arginyl)-aminopenicillansäure-hydrochlorid zu isolieren: 3.09 g des erhaltenen blaßgelben Pulvers wurden in 12 ccm Wasser gelöst und innerhalb von 45 Min. mit 3.7 ccm 1n Salzsäure versetzt, bis pH 2.5 erreicht war. Man extrahierte dreimal mit je 10 ccm Äther, brachte die gelbe, wässrige Lösung durch Zugabe von 2.45 ccm 1n Natronlauge auf pH 5 und

engte ein. Das nach Trocknen erhaltene blaßgelbe Pulver (2.23 g) enthielt, wie Dünnschichtchromatogramme (Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1 und Ameisensäure/Wasser/t-Butanol 15:15:70) zeigten, eine neue Substanz und Arginin, sowie geringe Mengen an Aminopenicillansäure und Triäthylaminhydrochlorid. Durch Umfällen aus Methanol/Äther wurde eine Substanz (Zers.-P. ab 170°) erhalten, die noch wenig Arginin als Verunreinigung enthielt. Weitere Reinigungsversuche blieben ohne Erfolg; die gefundenen Analysenwerte lassen sich durch diese Verunreinigungen nicht erklären.

Für 6-(L-Arginyl)-aminopenicillansäure-hydrochlorid

Ber. C 41.15 H 6.11 N 20.60

Gef. C 39.83 H 6.93 N 18.37

Das aus der wäßrigen Lösung erhaltene Rohprodukt wurde mikrobiologisch untersucht. Es zeigte gegen E. coli und gegen B. Subt. keine Wirksamkeit.

3. L-Histidyl-glycin

3.1 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-histidin-kalium

Man versetzte eine Suspension von 0.83 g (5.34 mMol) L-Histidin in 5 ccm Methanol mit 2.00 ccm 2.53n methanolischer Kalilauge (5.06 mVal) und erhitze kurz zum Sieden. Nach Abtrennung von überschüssiger Aminosäure (0.03 g) wurde zum siedenden Filtrat eine Lösung von 0.51 g (5.06 mMol) Acetylaceton in heißem Methanol zugegeben; dabei fiel ein farbloser kristalliner Niederschlag aus. Man rührte 2 Stdn. bei Raumtemperatur; nach dieser Zeit war an dem Lösungsvorgang und der Gelbfärbung der Beginn der Umsetzung zu erkennen. Nach 46 Stdn. filtrierte man die Lösung von Spuren nicht umgesetzten Histidins ab. Die nach Abziehen des Methanols als Rückstand anfallende blaßgelbe, schaumige Substanz wurde mehrmals mit Äther durchgerieben und getrocknet. Die Ausbeute an pulvriger Substanz betrug 1.12 g (80%). Zers.-P. ab 50°.

Die hygroskopische Substanz ist leicht löslich in Dimethylformamid und in Äthanol. Ihre wäßrige Lösung zeigte einen pH-Wert von 7.5. Mit Eisen(III)-chlorid gab sie eine kräftigblaue Farbreaktion, die langsam nach Rot überging.

Zur Analyse wurde die Verbindung zweimal aus Äthanol/Äther umgefällt (Zers.-P. ab 135°). Sie war dünnschichtchromatographisch rein (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1)

3.550 mg Substanz, 6.157 mg CO₂, 1.900 mg H₂O
2.890 mg Substanz, 0.396 ccm N₂, (25°, 722 Torr)

C₁₁H₁₄KN₃O₃ (275.4)

Ber. C 47.99 H 5.12 N 15.27

Gef. C 47.33 H 5.99 N 14.91

MAV-L-Histidin-kalium, in Dimethylformamid gelöst, zersetzt sich während zweitägigem Stehen bei Raumtemp. nicht (Dünnschichtchromatogramm in Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1).

Als man versuchte, MAV-L-Histidin-kalium mit Hilfe eines Ionenaustauschers in MAV-L-Histidin zu überführen, wurde eine unreine Substanz isoliert; in Dimethylformamid gelöst, trat schon bei Raumtemp. Abspaltung der Schutzgruppe ein.

Ein Versuch, L-Histidin mit Acetylaceton (Molverhältnis 1:1) in Methanol umzusetzen, ergab in schlechter Ausbeute sehr unreines MAV-L-Histidin. Nach sechswöchigem Stehen bei Raumtemp. hatte nur ein geringer Teil der Aminosäure reagiert (Dünnschichtchromatogramm in Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1).

3.2 N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-L-histidyl-glycin

Eine Lösung von 0.98 g (3.56 mMol) MAV-L-Histidin-kalium in 20 ccm Dimethylformamid wurde bei 0° mit 0.74 g (3.56 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid und 0.50 g (3.56 mMol) Glycinäthylester-hydrochlorid versetzt. Nachdem die blaßgelbe Suspension 6.5 Stdn. bei 0° gerührt worden war, stand sie 12 Stdn. bei 4°. Man saugte von einem farblosen Rückstand (0.73 g) ab, der aus Kaliumchlorid, Dicyclohexylharnstoff und Histidin bestand. Die klare, gelbe Mutterlauge hinterließ nach Eindunsten und Trocknen i. Vak. 1.49 g gelbes, öliges Kristallisat. Man rührte dieses mit Petroläther (30-60°) und erhielt aus der Lösung 0.41 g einer farblosen, kristallinen Substanz, die nach Umkristallisieren aus Petroläther bei 59-61° schmolz. Sie wurde durch Mischschmelzpunkt, Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) und Analyse als MAV-Glycinäthylester identifiziert.

Der in Petroläther unlösliche Anteil wurde mit Äther verrieben, wobei 0.48 g eines blaßgelben Pulvers zurückblieben.

Man löste in 5 ccm Wasser und 0.5 ccm Äthanol und filtrierte von 0.11 g farblosem Rückstand (Dicyclohexylharnstoff) ab. Zu dem klaren Filtrat tropfte man unter Rühren während 3 Stdn. 0.97 ccm 1n Natronlauge so, daß der pH-Wert 11.5 nicht überschritten wurde. Nach 12-stdg. Stehen bei 4° (noch pH 10.0) wurde von wenig, schmierig ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff abgegossen. Man brachte die Lösung durch Zugabe von 0.61 ccm 1n Salzsäure auf pH 6.0 und ließ 5 Tage bei 4° stehen. Die dabei ausgefallenen farblosen Nadeln (0.11 g; 9%) hatten einen Zers.-P. von 218-220°. Ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) zeigte, daß reines MAV-L-Histidyl-glycin vorlag.

Die Substanz ist in Dimethylformamid und Wasser kaum löslich. Sie gibt mit Eisen(III)-chlorid eine rötliche Färbung, die langsam in kräftiges Rot übergeht. Zur Analyse wurde 20 Stdn. bei Raumtemp. und 8 Stdn. bei 90° getrocknet, wobei sich der Zers.-P. nicht änderte.

2.685 mg Substanz, 5.120 mg CO₂, 1.460 mg H₂O

3.398 mg Substanz, 0.587 ccm N₂, (24°, 712 Torr)

C₁₃H₁₈N₄O₄ · 0.25 H₂O (298.9)

Ber. C 52.23 H 6.25 N 18.75

Gef. C 52.04 H 6.08 N 18.60

Bei Durchführung der unter 3.2 beschriebenen Synthese in Chloroform erhielt man MAV-L-Histidyl-glycin in noch geringerer Ausbeute.

Als MAV-L-Histidin mit Glycinäthylester analog 3.2 umgesetzt und aufgearbeitet wurde, fielen nur Spuren an N-geschütztem Dipeptid aus.

3.3 L-Histidyl-glycin

Man löste 0.09 g (0.31 mMol) des nach 3.2 dargestellten MAV-L-Histidyl-glycins in 2 ccm Wasser und 0.5 ccm Äthanol (pH 5.3), versetzte mit 0.31 ccm 1n Salzsäure und ließ 7 Stdn. bei Raumtemp. stehen. Nach dieser Zeit hatte sich der pH-Wert der farblosen Lösung auf 3.3 eingestellt. Man schüttelte 5mal mit je 3 ccm Äther aus und dunstete die wäßrige Fraktion ein; es blieb eine farblose Substanz (0.06 g; 78%) als glasartiger Film zurück. Aus Wasser/Aceton erhielt man körnige Kristalle vom Zers.-P. 224-228°

(Lit. 229-230⁰). Ein Dünnschichtchromatogramm in Ameisensäure/Wasser/t-Butanol (15:15:70) zeigte, daß die Verbindung rein war.

6.748 mg Substanz, 9.503 mg CO₂, 3.290 mg H₂O
3.360 mg Substanz, 0.696 ccm N₂, (23⁰, 718 Torr)

C₈H₁₃ClN₄O₃ (248.7)

Ber. C 38.68 H 5.26 N 22.54

Gef. C 38.43 H 5.45 N 22.57

$$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -30.6^{\circ} \quad (c=0.83; \text{H}_2\text{O})$$

N.C. Davis, (34) fand für L-Histidyl-glycin-hydrochlorid · 0.5 H₂O

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.4 \quad (c=1; \text{H}_2\text{O})$$

3.4 Umsetzungen von L-Histidin mit weiteren β-Dicarbonylverbindungen

3.4a) mit Cyclopentanon(2)-carbonsäure(1)-äthylester

Man versetzte eine nach Versuch 3.1 erhaltene Lösung von 4.45 mMol L-Histidin-kalium in 5 ccm Methanol mit 0.70 g (4.45 mMol) Cyclopentanon(2)-carbonsäure(1)-äthylester und rührte die entstandene farblose Suspension 8 Tage bei Raumtemperatur. Da nach dieser Zeit keine Veränderung des Reaktionsgemisches zu erkennen war, wurde erst nach sechswöchigem Stehen aufgearbeitet. Nach Absaugen und Trocknen erhielt man 0.06 g Histidin zurück, das sind fast 9%. Beim Aufarbeiten der Mutterlauge analog 3.1 wurden 1.27 g blaßgelbes, hygroskopisches Pulver erhalten. Ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) zeigte eine durch wenig Histidin verunreinigte neue Substanz. Die mit Eisen(III)-chlorid auftretende kräftig grüne Färbung ging sehr rasch nach Tiefblau über. Schon bei Aufbewahrung in trockenem Zustand zerfiel die Substanz.

3.4b) mit Benzoylacetone

Man setzte L-Histidin-kalium mit Benzoylacetone nach 3.4a um und arbeitete analog auf. Das isolierte Produkt enthielt neben Histidin und Benzoylacetone nur Spuren einer neuen Substanz (Dünnschichtchromatogramm in Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1).

4. L-Methionyl-glycin

4.1 N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-methionin-kalium

Man rührte eine Suspension von 2.60 g (12.98 mMol) Benzoylacetone-kalium und 1.78 g (11.90 mMol) L-Methionin in 25 ccm Äthanol während 12 Std. bei Raumtemperatur. Die erhaltene blaßgelbe Lösung filtrierte man von Spuren nicht umgesetzten L-Methionins ab und engte zur Trockne ein. Als Rückstand verblieben blaßgelbe, hygroskopische Kristalle (3.54 g; 80%), die nach Umkristallisieren aus Äthanol farblose Spieße vom Zers.-P. 230-233° ergaben.

Die Substanz löst sich in Wasser, Äthanol, Chloroform, Tetrahydrofuran und Essigester leicht; in Äther ist sie schwer löslich. Ein Dünnschichtchromatogramm in Äthanol (99proz.) zeigte eine durch wenig Methionin verunreinigte neue Substanz. Die Verbindung wurde durch Überführung in MBV-L-Methionyl-glycinäthylester identifiziert.

Als man den vorstehend beschriebenen Versuch in der Siedehitze ausführte, wurde ein weniger reines MBV-L-Methionin-kalium in einer Ausbeute erhalten, die unter 50% lag. Auch bei einer Umsetzung von Benzoylacetone mit L-Methionin-kalium war die Ausbeute geringer.

4.2 N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-methionyl-glycinäthylester

Eine auf -18° gekühlte Lösung von 1.11 g (3.35 mMol) MBV-L-Methionin-kalium in 20 ccm Tetrahydrofuran wurde mit einer vorgekühlten Lösung von 0.40 g (3.35 mMol) Pivaloylchlorid in 3 ccm Tetrahydrofuran versetzt und 2 Std. bei dieser Temp. gerührt. Nach Zugabe einer vorgekühlten Lösung von 0.35 g (3.35 mMol) frischdestillierten Glycinäthylesters in 2 ccm Tetrahydrofuran ließ man die blaßgelbe Suspension 12 Std. bei 4° stehen. Der nach Abziehen des Lösungsmittels erhaltene, ölige Rückstand wurde in Essigester/Wasser aufgenommen. Man schüttelte die Essigesterfraktion zweimal mit je 8 ccm 3proz. Natriumbicarbonat-Lösung und dreimal mit je 8 ccm Wasser aus und trocknete sie über Natriumsulfat. Das nach Abziehen des Lösungsmittels verbliebene, blaßgelbe Öl verfestigte sich bei Zugabe von Äther zu einem farblosen Kristallinat (0.81 g; 64%). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol/Äther/Petroläther lag der Schmp. der Substanz bei 64-68°.

Die Substanz ist in Äthanol leicht, in Äther mäßig löslich. In einem Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Chloroform/Essigester 3:1) war sie rein. Mit Eisen(III)-chlorid tritt grüne Farbreaktion auf.

2.948 mg Substanz, 6.546 mg CO₂, 1.820 mg H₂O

3.286 mg Substanz, 0.227 ccm N₂, (24⁰, 723 Torr)

C₁₉H₂₆N₂O₄S (378.4)

Ber. C 60.29 H 6.93 N 7.40

Gef. C 60.60 H 6.91 N 7.55

Als Glycinäthylester-hydrochlorid unter Zusatz von einem Äquivalent Triäthylamin mit MBV-L-Methionin-kalium umgesetzt wurde, erhielt man MBV-L-Methionyl-glycinäthylester als ein durch Benzoylacetone verunreinigtes Öl (Dünnschichtchromatogramm in Chloroform/Essigester 7:3).

Versuche, MBV-L-Methionyl-glycinäthylester nach der Carbodiimid-Methode in Tetrahydrofuran darzustellen, ergaben ein unreines Produkt. Durch Säulenchromatographie (Elutionsmittel: Chloroform/Essigester 7:3) ließen sich nur Spuren an reiner Substanz abtrennen. — In einer Peptid-Synthese nach der Cyanmethylester-Methode fand nur teilweise Umsetzung statt. Ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Äthanol 99proz.) zeigte MBV-L-Methionyl-glycinäthylester in der gleichen Konzentration wie die Ausgangssubstanzen.

4.3 N-[1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl]-L-methionin-kalium

Man versetzte eine nach Versuch 3.1 erhaltene Lösung von 7.61 mMol L-Methionin-kalium in 10 ccm Methanol mit einer heißen Lösung von 0.99 g (7.61 mMol) Acetessigsäureäthylester in 5 ccm Methanol und ließ während 14 Stdn. bei Raumtemp. stehen. Den nach Eindunsten der farblosen Lösung erhaltenen kristallinen, hygroskopischen Rückstand löste man in Äther und filtrierte von 0.01 g Methionin ab. Die nach Abziehen des Äthers verbliebenen farblosen Kristalle (1.96 g; 86%) schmolzen nach Umkristallisieren aus Äthanol bei 63-65⁰. Ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1) zeigte eine reine neue Substanz.

Die Verbindung ist in Wasser, Methanol, heißem Äthanol, Äther und Tetrahydrofuran leicht löslich. Mit Eisen(III)-chlorid zeigt sie eine weinrote, nach kurzer Zeit braunrote Farbreaktion.

3.200 mg Substanz, 5.060 mg CO₂, 1.900 mg H₂O
3.511 mg Substanz, 0.160 ccm N₂, (24°, 718 Torr)

C₁₁H₁₈KNO₄S (299.4)

Ber. C 44.12 H 6.06 N 4.68

Gef. C 43.15 H 6.64 N 4.94

Bei der Umsetzung von Acetessigsäure-o-anisidid mit L-Methionin-kalium und Aufarbeitung analog 4.3 wurde ein blaßgelbes Produkt erhalten, das sich nicht reinigen ließ. Das aus Äthanol/Äther umgefällte Produkt war ölig und zerfiel schon bei Raumtemp. in die Komponenten, auch im Dünnschichtchromatogramm (Äthanol 95proz.). Die mit Eisen(III)-chlorid auftretende grüne Farb-reaktion ging sehr schnell nach Violettrot über.

Bei Versuchen, L-Methionin mit Diacetylmonoxim (äquivalente Mengen in Methanol) umzusetzen, wurden nach zweitägigem Rühren bei Raumtemp. die Ausgangssubstanzen fast quantitativ wiedergewonnen. Ein Dünnschichtchromatogramm in Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1 zeigte, daß sich keine neue Verbindung gebildet hatte.

4.4 N-[1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl]-L-methionyl-glycinäthylester

Man versetzte eine Lösung von 1.96 g (6.55 mMol) MAeV-L-Methionin-kalium in 10 ccm Tetrahydrofuran bei -16° mit 3 Tropfen Triäthylamin und mit einer gekühlten Lösung von 0.79 g (6.55 mMol) Pivaloylchlorid. Nach einstündigem Rühren gab man bei -16° zu dem gemischten Anhydrid 0.68 g (6.55 mMol) Glycinäthylester und ließ während 14 Stdn. bei 4° stehen. Nach Absaugen des Ungelösten (0.73 g) und nach Eindunsten des Filtrats wurde ein farbloses Öl erhalten, das sich beim Trocknen über KOH zu einem Kristallkuchen verfestigte. Das zweimal mit je 10 ccm Äther verriebene Kristallisat löste sich bis auf Spuren in Essigester. Nach Eindunsten des Filtrats verblieben 1.20 g (53%) einer farblosen, kristallinen Substanz. Aus Äthanol unter Zusatz von wenig Wasser umkristallisiert, hatte die Verbindung einen Schmp. von 98-100° und war im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1) einheitlich.

MAeV-L-Methionyl-glycinäthylester ist in Äthanol, Essigester und Tetrahydrofuran leicht, in Wasser und Äther schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid trat erst nach einigen Min. Rotfärbung auf.

4.191 mg Substanz, 7.997 mg CO₂, 2.870 mg H₂O
4.305 mg Substanz, 0.324 ccm N₂, (26°, 728 Torr)

C₁₅H₂₆N₂O₅S (346.5)

Ber. C 52.00 H 7.57 N 8.09

Gef. C 52.07 H 7.66 N 8.23

4.5 L-Methionyl-glycin

Eine Lösung von 0.61 g (1.76 mMol) MAeV-L-Methionyl-glycinäthylester in 8 ccm Dioxan/Wasser (1:1) wurde innerhalb von 30 Min. mit 1n Natronlauge (etwa 1.94 ccm) so versetzt, daß der pH-Wert 13.5 nicht überschritten wurde. Man ließ 2 Stdn. bei Raumtemp. stehen, engte ein und nahm das verbliebene farblose Öl in 5 ccm Methanol auf. Eine mit 10 g Ionenaustauscher IV (Merck, Darmstadt) gefüllte Säule, die mit 6n Salzsäure aufbereitet und in Methanol gequollen war, wurde mit der methanolischen Lösung des N-geschützten Di-peptidnatrium-salzes beschickt und anschließend mit 80 ccm Methanol gewaschen. Der beim Eindunsten des Eluats verbliebene ölige Rückstand verfestigte sich bei Zugabe von Äther zu einer wachsartigen, blaßgelben Substanz (0.45 g; 81%). Nach mehrmaligem Verreiben mit Äther war die Substanz dünnschichtchromatographisch rein (Laufmittel: Methanol/Wasser 4:1 und Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) und hatte einen Zers.-P. von 173-176°. — MAeV-L-Methionyl-glycin ist in Wasser leicht, in Methanol, Äthanol und Essigester mäßig löslich. Mit Eisen(III)-chlorid tritt erst nach einigen Min. rotbraune Farbreaktion auf.

Zur Abspaltung der Schutzgruppe versetzte man eine Lösung von 0.37 g (1.16 mMol) MAeV-L-Methionyl-glycin in 5 ccm Wasser/Methanol (4:1) mit Eisessig bis pH 3.6 erreicht war, ließ 20 Stdn. bei Raumtemp. stehen und schüttelte dreimal mit je 5 ccm Essigester aus. Die wässrige Phase (pH = 4) hinterließ nach Abziehen des Lösungsmittels und Trocknen 0.28 g einer farblosen feinkristallinen Substanz, die in Dünnschichtchromatogrammen mit verschiedenen Lösungsmitteln den gleichen RF-Wert wie L-Methionin und MAeV-L-Methionyl-glycin zeigte. Nach Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser zersetzte sich die Verbindung (0.18 g; 76%) bei 178-200° (Lit. (35): 182-183° und 211-212°).

3.231 mg Substanz, 4.815 mg CO₂, 1.990 mg H₂O
3.171 mg Substanz, 0.398 ccm N₂, (24°, 716 Torr)

C₇H₁₄N₂O₃S (206.3)

Ber. C 40.76 H 6.84 N 13.58

Gef. C 40.67 H 6.89 N 13.59

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +84.4^{\circ} \quad (c=2.06; \text{H}_2\text{O})$$

Für die Drehung in Wasser fanden:

K. Hofmann und Mitarb. (35):

$$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +83.0^{\circ} \quad (c=1.9; \text{H}_2\text{O})$$

C.A. Dekker und Mitarb. (35):

$$[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +86.8^{\circ} \quad (c=2; \text{H}_2\text{O})$$

5. Umsetzung von N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-glutaminsäure-bis-
kalium mit Glycinäthylester nach der Cyanmethylester-Methode

a) Darstellung des Cyanmethylesters

Man erhitzte eine Suspension von 1.77 g (4.82 mMol) MBV-L-Glutaminsäure-bis-kalium in einer Lösung von 2.18 g (28.88 mMol) Chloracetonitril und 0.05 g Triäthylamin in 30 ccm Essigester unter Rühren auf 50-70°. Nach einer Reaktionszeit von 40 Min. wurde das in der Kälte ausgefallene Kaliumchlorid und Triäthylamin-hydrochlorid (0.76 g) von der gelben Lösung abgetrennt. Man behandelte das nach Einengen verbliebene gelbe Öl zweimal mit je 10 ccm Äther und nahm in Essigester auf. Die nach Waschen mit 8 ccm Wasser und nach Trocknen über Natriumsulfat erhaltene Essigesterlösung hinterließ nach Eindunsten 0.87 g (49%) gelben Öls, das durch Spuren von Benzoylacetone verunreinigt war (Dünnschichtchromatogramm in Chloroform/Essigester 3:1).

Der Cyanmethylester ist in Essigester leicht, in Äthanol mäßig und in Äther und Petroläther schwer löslich. Seine Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid geht nach einigen Min. von Grün nach Rot über. Da die Substanz nicht gereinigt werden konnte, wurde sie als Rohprodukt weiter umgesetzt (5.b). Als man die Reaktion ohne Triäthylamin in der Siedehitze während 5.5 Stdn. durchführte, betrug die Ausbeute an öligem Reaktionsprodukt 41 %.

In einem Versuch, Benzoylaceton-kalium (2 Äquivalente) mit L-Glutaminsäure in siedendem Äthanol umzusetzen, isolierte man nur Ausgangsprodukte. — Bei Versuchen, MBV-L-Glutaminsäure-bis-kalium durch vorsichtiges Ansäuern mit Essigsäure in MBV-L-Glutaminsäure zu überführen, ließ sich die N-geschützte Aminosäure nicht erhalten.

b) Umsetzung des Cyanmethylesters mit Glycinäthylester

0.77 g (2.14 mMol) des rohen MBV-L-Glutaminsäure-cyanmethylesters wurden mit 0.88 g (8.56 mMol) Glycinäthylester in 5 ccm Essigester 1 Stde. bei 50-60° (Ölbad) gerührt. Man behandelte das nach Abziehen des Lösungsmittels erhaltene braune Öl mit Äther, nahm den Rückstand erneut in Essigester auf und filtrierte von wenig Glutaminsäure ab. Das nach Eindunsten anfallende gelbbraune Öl (0.40 g; 41%) war, wie ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Chloroform/Essigester 3:1) zeigte, mit einer authentischen Probe von MBV-L-Glutamyl-bis-glycinäthylester (P. Konrad, 3) identisch. P. Konrad hatte diese Verbindung als feste Substanz erhalten.

Bei Aufarbeiten der Ätherfraktion erhielt man eine Substanz, die durch Mischschmp. und Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Chloroform/Essigester 3:1) als MBV-Glycinäthylester identifiziert wurde.

6. Abspaltung der Aminoschutzgruppe Benzoylaceton durch Amine

6.1 Umsetzung von N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-glycin mit Phenylhydrazin

Man tropfte zu einer Suspension von 0.15 g (0.69 mMol) MBV-Glycin in 15 ccm Toluol unter Rühren eine Lösung von 0.07 g (0.69 mMol) Phenylhydrazin in 5 ccm Toluol. Dabei verdickte sich die Suspension; man rührte noch 45 Min. bei Raumtemp. und isolierte eine farblose Substanz (0.21 g; 93%) vom Schmp. 126°. Ein Dünnschichtchromatogramm in Äthanol (99proz.) zeigte, daß die Verbindung durch wenig Glycin verunreinigt war.

Die Substanz ist nur in heißem Äthanol und in Äthanol/Wasser leicht löslich. Mit Eisen(III)-chlorid gibt sie eine blaue Farbreaktion, die beim Erwärmen verschwindet. Der Gehalt an freiem Glycin war nach zweiwöchigem Stehen bei Raumtemp. angestiegen, wie ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Äthanol 99proz.) zeigte.

Die Substanz ließ sich in ähnlicher Ausbeute auch aus MBV-Glycin-kalium und Phenylhydrazin-hydrochlorid in Chloroform und in Toluol erhalten, allerdings nicht frei von Kaliumchlorid. Zur Erklärung der Analysenwerte wurde eine solche Verunreinigung herangezogen.

3.133 mg Substanz, 7.264 mg CO₂, 1.720 mg H₂O

3.455 mg Substanz, 0.381 ccm N₂, (25°, 707 Torr)

C₁₈H₂₁N₃O₃ · 0.22 KCl (343.8)

Ber. C 62.92 H 6.16 N 12.22

Gef. C 63.27 H 6.14 N 11.78

Als man die Verbindung C₁₈H₂₁N₃O₃ während 2 Tagen bei Raumtemp. in Methanol rührte, isolierte man 87 % Glycin und 95 % Benzoylacetone-phenylhydrazon, das in einem Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Chloroform) identifiziert wurde. MBV-Glycin war nach zweitägigem Stehen bei Raumtemp. nicht zerfallen.

Bei der Einwirkung von Diazomethan auf die Verbindung C₁₈H₂₁N₃O₃ in Methanol erhielt man Glycin (65 %) und MBV-Glycinmethylester. Durch 2n Salzsäure wird die Verbindung C₁₈H₂₁N₃O₃ teilweise in Benzoylacetone, Glycin und Phenylhydrazin-hydrochlorid gespalten. Benzoylacetone-phenylhydrazon wird unter den gleichen Bedingungen nicht verseift (Dünnschichtchromatogramm in Chloroform).

6.2 Umsetzung von N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-glycin-kalium

6.2a mit Phenylhydrazin-hydrochlorid

Zu einer Lösung von 0.30 g (1.17 mMol) MBV-Glycin-kalium in 10 ccm Methanol gab man eine Lösung von 0.17 g (1.18 mMol) Phenylhydrazin-hydrochlorid in 5 ccm Methanol. Aus der dann blaßgelben Lösung begann ein farbloser Niederschlag auszufallen. Das Reaktionsgemisch wurde eine halbe Stde. bei Raumtemp. gerührt und 12 Stdn. bei dieser Temperatur belassen. Man erhielt 0.07 g einer Mischung von Kaliumchlorid und Glycin. Weitere 0.07 g dieser Mischung (insgesamt 80 %) fielen an, als man die methanolische Mutterlauge einengte und den öligen Rückstand mit Äther verrieb. Die Ätherlösung enthielt als blaßgelben, öligen Rückstand 0.28 g (95 %) Benzoylacetone-phenylhydrazon, das dünnschichtchromatographisch identifiziert wurde (Laufmittel: Chloroform).

Nach der Umsetzung von MBV-Glycin-kalium mit Phenylhydrazin-acetat analog 6.2a isolierte man Glycin (91 %) und Kalium-acetat.

Als MBV-Glycin-äthylester mit Phenylhydrazin (1 Äquivalent) 24 Stdn. in Toluol gerührt wurde, blieb der N-geschützte Aminosäureester unverändert. Bei Verwendung von Chloroform anstelle von Toluol trat infolge Anwesenheit geringer Mengen Salzsäure Abspaltung der Schutzgruppe ein.

Untersuchung der Beständigkeit von MBV-Glycinäthylester:

Man erhitzte je eine Probe MBV-Glycin-äthylester auf 180°, 240° und 290°. Ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Äthanol 99proz.) zeigte, daß erst bei 290° geringe Abspaltung der Schutzgruppe eingetreten war. Auch in methanolischer Lösung hatte sich nach 6 Monaten nur ein kleiner Teil des eingesetzten MBV-Glycin-äthylesters verändert. Die dabei in Spuren gebildete Substanz ließ sich mit Chloroform/Äther umfällen, wurde aber nicht identifiziert.

6.2b mit Hydroxylamin-hydrochlorid

Man rührte eine Mischung von 0.30 g (1.17 mMol) MBV-Glycin-kalium und 0.08 g (1.17 mMol) Hydroxylamin-hydrochlorid in 20 ccm Methanol während 4 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach 12 Stdn. trennte man 0.08 g (95%) Glycin ab, das Spuren von Kaliumchlorid enthielt. Die Mutterlauge hinterließ nach Abziehen des Lösungsmittels 0.27 g eines bräunlichen festen Produkts. Es setzte sich zusammen aus Kaliumchlorid und einer Substanz, die aus der heißen wäßrigen Lösung dieser Mischung in der Kälte ausfiel. Die Verbindung schmolz nach Umkristallisieren aus Wasser bei 61-65° und gab mit Eisen(III)-chloridlösung keine Farbreaktion. Anscheinend haben wir das von G. Ceresole (41) erstmals dargestellte und von L. Claisen (42) unter ähnlichen Bedingungen erhaltene 3-Methyl-5-phenyl-isoxazol (Schmp. 67-68°), das Kondensationsprodukt des Benzoylacetone-monoxims, isoliert.

Bei der Durchführung dieser Umsetzung in Toluol isolierte man 100 % einer Mischung von Glycin und Kaliumchlorid. — Bei der Umsetzung äquivalenter Mengen MBV-Glycin-kalium und Triäthylamin-hydrochlorid in Methanol trat geringfügige Abspaltung der Schutzgruppe (5%) ein.

7. Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid

7.1 N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-glycin-2-pyridylamid

Man versetzte eine Suspension von 5.00 g (19.4 mMol) MBV-Glycin-kalium in 55 ccm Tetrahydrofuran mit 10 Tropfen Triäthylamin, kühlte auf -15° und rührte nach Zugabe einer Lösung von 2.34 g (19.4 mMol) Pivaloylchlorid in 3 ccm Tetrahydrofuran 1 Stde. bei -12° . Die blaßgelbe, trübe Lösung des gemischten Anhydrids versetzte man mit 1.83 g (19.4 mMol) 2-Aminopyridin, gelöst in 5 ccm Tetrahydrofuran. Die bei der Zugabe entstandene Suspension hatte sich nach 4 Stdn. verdickt. Im Verlauf von 7 Stdn. ließ man die Temperatur auf 20° ansteigen und rührte noch 15 Stunden. Der farblose Niederschlag (1.96 g) wurde von der intensiv gelben Lösung abgetrennt. Durch Behandeln mit siedendem Methanol eluierte man aus diesem 0.81 g reines MBV-Glycin-2-pyridylamid.

Man dunstete die Tetrahydrofuran-Lösung ein und verrieb den Rückstand mit Äther. Das nicht gelöste blaßgelbe Produkt (2.19 g) ergab nach Umkristallisieren aus Methanol 0.94 g farblose, verfilzte Nadeln vom Schmp. $208-210^{\circ}$. Die Gesamtausbeute an reinem N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-glycin-2-pyridylamid betrug 31 %. In einem Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Chloroform/Essigester 3:1) zeigte sich eine einheitliche Substanz.

Die Verbindung ist in Methanol, Äthanol, Dimethylformamid, Aceton, Chloroform, Essigester und Tetrahydrofuran mäßig, in Wasser und Äther schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid gibt sie eine zunächst blaßgrüne Farbreaktion, die schnell in kräftig Grün und nach einigen Min. in Rot übergeht. Die Substanz verfärbt sich bei Lichteinwirkung nach Dunkelgelb.

Nach Eindunsten der methanolischen Mutterlauge verblieben 1.16 g eines blaßgelben Rückstands, der hauptsächlich aus MBV-Glycin bestand (durch Schmp., Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid und Dünnschichtchromatogramm identifiziert).

3.090 mg Substanz, 7.834 mg CO_2 , 1.610 mg H_2O

3.176 mg Substanz, 0.407 ccm N_2 , (26° , 724 Torr)

$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ (295.4)

Ber. C 69.15 H 5.81 N 14.23

Gef. C 69.19 H 5.83 N 13.94

Das Amid wurde auch ausgehend von MBV-Glycin unter Zusatz einer äquivalenten Menge von Triäthylamin erhalten.

Überführung in das Hydrochlorid $C_{17}H_{17}N_3O_2 \cdot HCl \cdot 0.5 H_2O$:

Zu einer Suspension von 0.30 g (1.00 mMol) MBV-Glycin-2-pyridylamid in 15 ccm Aceton tropfte man während 5 Min. 1.00 ccm 1n Salzsäure. Dabei sank der pH-Wert von 6.7 auf 0.2. Gegen Ende der Zugabe fiel ein farbloser, käsi-ger Niederschlag aus. Man rührte noch 10 Min. und filtrierte die ausgefallene farblose Substanz ab (0.18 g; Zers.-P. 140-150°). Das auf 2 ccm eingeeengte Filtrat wurde mit Äther versetzt, wobei noch 0.08 g der Verbindung ausfielen. Die Gesamtausbeute betrug 78 %.

Die Substanz ist in Methanol leicht, in Äthanol schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid ergibt sie eine gelbbraune Färbung, die allmählich in Rot übergeht. Zur Analyse wurde aus Methanol/Äther umgefällt, wobei der Zers.-P. auf 150-158° stieg.

3.860 mg Substanz, 8.511 mg CO_2 , 1.940 mg H_2O

3.550 mg Substanz, 0.402 ccm N_2 , (24°, 732 Torr)

$C_{17}H_{17}N_3O_2 \cdot HCl \cdot 0.5 H_2O$ (340.8)

Ber. C 59.90 H 5.61 N 12.32

Gef. C 60.17 H 5.62 N 12.54

Im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Chloroform/Essigester 3:2) hat die Substanz den gleichen RF-Wert wie MBV-Glycin-2-pyridylamid. Bei Erhitzen in Wasser oder Äthanol trat Abspaltung der Schutzgruppe ein; als man eine wäßrige Lösung von MBV-Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid 5 Min. zum Sieden erhitzte, wurde in 100proz. Ausbeute Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid erhalten. — Bei Durchführung des vorstehend beschriebenen Versuchs in Methanol isolierte man in 67proz. Ausbeute reines Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid und daneben reines MBV-Glycin-2-pyridylamid.

7.2 Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid

Man versetzte eine Suspension von 0.20 g (0.68 mMol) MBV-Glycin-2-pyridylamid in 10 ccm Wasser mit 0.75 ccm 1n Salzsäure und erhitzte zum Sieden. Nach 10 Min. wurde eine farblose Lösung erhalten, die man noch 10 Min.

erhitzte. Aus der abgekühlten Lösung schied sich Benzoylacetone ab, das man durch Ausschütteln mit Äther abtrennte (0.09 g; 82%). Das nach Eindunsten der wäßrigen Phase erhaltene farblose Kristallisat wurde mit wenig Äther verrieben. Die Ausbeute betrug 0.12 g (94%). Die nach Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser erhaltenen farblosen, filzigen Nadeln schmolzen bei 222-224° unter Zersetzung.

Die Substanz ist in Methanol mäßig, in Äthanol und Äther schwer löslich. Ihre wäßrige Lösung zeigt einen pH-Wert von 3.5. Dünnschichtchromatogramme zeigten, daß eine reine Substanz vorlag (in Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1 RF-Wert wie Glycin, und in Ameisensäure/Wasser/t-Butanol 15:15:70 RF-Wert wie MBV-Glycin-2-pyridylamid).

3.395 mg Substanz, 5.558 mg CO₂, 1.640 mg H₂O

2.565 mg Substanz, 0.531 ccm N₂, (24°, 718 Torr)

C₇H₉N₃O · HCl (187.6)

Ber. C 44.88 H 5.37 N 22.41

Gef. C 44.68 H 5.40 N 22.48

Als man eine Lösung von MBV-Glycin-2-pyridylamid in überschüssiger 2n Salzsäure eine Stde. erhitzte, wurde die Amidbindung nicht gespalten; man isolierte in quantitativer Ausbeute Glycin-2-pyridylamid-hydrochlorid.

8. Umsetzung von Glycinäthylester mit Phenylbrenztraubensäure

8.1 Darstellung der Verbindung C₁₃H₁₅NO₄ · 0.5 H₂O

Die Darstellung der Phenylbrenztraubensäure erfolgte durch saure Hydrolyse von α-Acetaminosäure nach R.M. Herbst (38).

Zu einer Lösung von 2.20 g (13.4 mMol) Phenylbrenztraubensäure in 40 ccm Äther wurde unter Rühren eine Lösung von 1.10 g (10.6 mMol) Glycinäthylester in 20 ccm Äther getropft. Dabei fiel ein farbloser, käsiger Niederschlag aus. Man rührte die dickflüssige Suspension 40 Stdn. und erhielt 2.39 g (87%) einer farblosen Substanz vom Rohschmp. 126-128° (Zers.). Nach Umkristallisieren aus Äthanol (96proz.) schmolzen die farblosen Nadeln bei 139-142° (Zers.).

Die Substanz löst sich in Dimethylformamid, Methanol und Äthanol; in Wasser, Chloroform und Aceton ist sie mäßig, in Essigester, Acetonitril und Äther schwer löslich. Die Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid ist — wie die der Phenylbrenztraubensäure — grün. Dünnschichtchromatogramme zeigten, daß die Substanz rein war (in Äthanol/Wasser 5:1 RF-Wert wie der der Phenylbrenztraubensäure; in Dimethylformamid ein Fleck an der Lösungsmittelfront, der sich in seinem RF-Wert deutlich von den beiden Ausgangssubstanzen unterschied; in Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1 zwei Flecken, deren RF-Werte und deren Identifizierungsreaktionen mit denen von Glycinäthylester und Phenylbrenztraubensäure übereinstimmten). — Zur Analyse wurde bei Raumtemp. auf Gewichtskonstanz getrocknet.

4.369 mg Substanz, 9.645 mg CO₂, 2.400 mg H₂O
2.838 mg Substanz, 0.139 ccm N₂, (25°, 731 Torr)

C₁₃H₁₅NO₄ · 0.5 H₂O (258.3)

Ber. C 60.43 H 6.24 N 5.43

Gef. C 60.26 H 6.15 N 5.40

Äthoxylbestimmung:

3.076 mg Substanz 2.920 mg AgJ

Für -OC₂H₅: Ber. 17.46

Gef. 18.21

Die C-, H- und N-Werte wurden durch drei weitere Analysen bestätigt:

C 60.43 H 6.52 N 5.66

C 60.63 H 6.36 N 5.57

C 60.54 H 6.23 N 5.75

Als man äquivalente Mengen von Phenylbrenztraubensäure und Glycinäthylester miteinander umsetzte und nur 2 Stdn. reagieren ließ, lag die Ausbeute bei 76%. — Die Verbindung C₁₃H₁₅NO₄ · 0.5 H₂O wurde auch bei einer Umsetzung in Äthanol erhalten (Ausbeute: 67%). In dieser Reaktion isolierte man als Nebenprodukt eine farblose, kristalline Substanz vom Zers.-P. 220–225°. Sie gab mit Eisen(III)-chlorid keine Farbreaktion und war auf Grund eines Dünnschichtchromatogramms (Laufmittel: Äthanol/Wasser 5:1) einheitlich. Die Analysenwerte dieser Substanz ergaben eine Summenformel, deren Zusammensetzung nicht zu erklären war. Als man äquivalente Mengen Phenyl-

brenztraubensäure und Glycinäthylester in Dimethylformamid während 12 Stdn. reagieren ließ, wurde in geringer Ausbeute nur dieses Produkt vom Zers.-P. 220-225° isoliert.

3.645 mg Substanz, 8.181 mg CO₂, 2.010 mg H₂O

3.502 mg Substanz, 0.278 ccm N₂, (24°, 716 Torr)

C₁₇H₂₀N₂O₅ (332.4)

Ber. C 61.50 H 6.06 N 8.43

Gef. C 61.25 H 6.17 N 8.60

Die Substanz wurde nicht weiter untersucht.

Nach der Umsetzung der Verbindung C₁₃H₁₅NO₄ · 0.5 H₂O mit einer alkoholisch-schwefelsauren 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung wurde in 38proz. Ausbeute das 2.4-Dinitrophenylhydrazon der Phenylbrenztraubensäure erhalten (durch Mischschmp. (174-188°, Zers.) und IR-Spektrum identifiziert).

Die Verbindung C₁₃H₁₅NO₄ · 0.5 H₂O zerfiel bei Erhitzen in wäßriger Lösung; nach 16 Stdn. hatten sich 59% an Phenylbrenztraubensäure gebildet. Als man eine Lösung der Verbindung C₁₃H₁₅NO₄ · 0.5 H₂O in 2n Natronlauge mit 2n Schwefelsäure ansäuerte, wurden 50% an Phenylbrenztraubensäure erhalten.

Umsetzung von Phenylbrenztraubensäure mit Cyclohexylamin:

Zu einer Lösung von 3.05 g (18.5 mMol) Phenylbrenztraubensäure in 65 ccm Äther wurde unter Rühren eine Lösung von 1.84 g (18.5 mMol) Cyclohexylamin in 25 ccm Äther getropft. Dabei fiel ein farbloser Niederschlag aus. Man rührte die dickflüssige Suspension 20 Stdn. und erhielt 4.45 g (91%) eines farblosen Pulvers. Der Zers.-P. lag nach Umkristallisieren aus Äthanol bei 129-131° (Lit. (44): 108-109°).

Die Substanz ist in heißem Äthanol leicht, in Wasser (pH 7) mäßig und in Äther schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid tritt grüne Farbreaktion auf. In einem Dünnschichtchromatogramm (Luafmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1) war neben Phenylbrenztraubensäure keine neue Substanz zu erkennen.

2.582 mg Substanz, 6.480 mg CO₂, 1.920 mg H₂O

4.067 mg Substanz, 0.204 ccm N₂, (24°, 716 Torr)

C₁₅H₂₁NO₃ (263.4)

Ber. C 68.41 H 8.03 N 5.32

Gef. C 68.49 H 8.32 N 5.43

Als man die Verbindung $C_{15}H_{21}NO_3$ nach 8.2a mit 2n Salzsäure behandelte, erhielt man in quantitativer Ausbeute Phenylbrenztraubensäure und Cyclohexylamin-hydrochlorid. — Nach einer Umsetzung von Phenylbrenztraubensäure mit L-Methionin-methylester ließ sich kein definiertes Reaktionsprodukt isolieren.

8.2 Überführung der Verbindung $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot 0.5 H_2O$ in das Hydrochlorid $C_{13}H_{17}NO_5 \cdot HCl$ und in die Verbindung $C_{13}H_{17}NO_5$

8.2a Das Hydrochlorid $C_{13}H_{17}NO_5 \cdot HCl$

Eine Lösung von 5.05 g (19.5 mmol) der Verbindung $C_{13}H_{15}NO_4 \cdot 0.5 H_2O$ in 100 ccm 2n Salzsäure stand während 2 Std. bei Raumtemperatur; nach dieser Zeit hatten sich wenig farblose Kristalle abgeschieden. Man schüttelte dreimal mit insgesamt 250 ccm Äther aus, trocknete und erhielt nach Abziehen des Lösungsmittels 1.45 g (45%) Phenylbrenztraubensäure. Nach Eindunsten der wäßrigen Phase verblieb ein farbloses Kristallisat, das getrocknet und mit Äther verrieben wurde. Man erhielt 2.58 g eines farblosen Pulvers vom Zers.-P. 159–160°. Aus der eingeeengten ätherischen Lösung wurden 1.52 g eines farblosen Rückstands erhalten, der nach Umkristallisieren aus Äthanol noch 0.60 g der Substanz vom Zers.-P. 160° lieferte. Die Gesamtausbeute betrug 54%. Zur Analyse wurde aus Äthanol umkristallisiert und bei Raumtemp. auf Gewichtskonstanz getrocknet. Zers.-P. 153–165°. Dünnschichtchromatogramme zeigten eine reine neue Substanz (Laufmittel: Pyridin/t-Amylalkohol/Wasser 1:1:1 und Äthanol/Wasser 5:1). Die äthanolische Mutterlauge enthielt Glycinäthylester-hydrochlorid.

Die Substanz ist in Wasser, Methanol und Dimethylformamid leicht, in Äthanol mäßig löslich. In Aceton, Essigester, Chloroform und Äther ist sie schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid tritt keine Farbreaktion auf. — Die Verbindung gibt mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin keinen Niederschlag.

4.572 mg Substanz, 8.380 mg CO_2 , 2.450 mg H_2O

3.434 mg Substanz, 0.158 ccm N_2 , (26°, 722 Torr)

9.032 mg Substanz, 4.320 mg AgCl

$C_{13}H_{18}NO_5Cl$ (303.8)

Ber.	C 51.47	H 5.98	N 4.62	Cl 11.69
Gef.	C 50.02	H 6.00	N 4.99	Cl 11.82

Äthoxylbestimmung:

3.146 mg Substanz	2.570 mg AgJ
Für $-\text{OC}_2\text{H}_5$:	Ber. 14.83
	Gef. 15.68

Die Verbindung kann durch Glycinäthylester-hydrochlorid, das auf Grund ähnlicher Löslichkeiten schwer abzutrennen ist, verunreinigt sein; nimmt man 0.1 Mol dieser Verunreinigung pro Mol Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_5\text{Cl}$ an, dann errechnen sich folgende Analysenwerte:

C 50.61 H 5.98 N 4.85 Cl 12.32 OC_2H_5 15.60

Als man diese Umsetzung während 2 Stdn. in der Siedehitze durchführte, lagen die Ausbeuten zwischen 51 und 74% (die der Phenylbrenztraubensäure zwischen 32 und 47%).

8.2b Die Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$

Eine Lösung von 2.41 g (7.95 mMol) des Hydrochlorids $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5 \cdot \text{HCl}$ in 40 ccm Wasser wurde tropfenweise mit 8.2 ccm 1n Natronlauge versetzt, wobei der pH-Wert der farblosen Lösung von 1.3 auf 5.3 anstieg. Schon bei Raumtemp. begann sich aus der Reaktionslösung ein farbloser Niederschlag auszuscheiden, der sich beim Abkühlen auf 0° vermehrte. Die erhaltene farblose Substanz (0.96 g) hatte einen Zers.-P. von $124\text{--}125^\circ$. Das Filtrat hinterließ nach Eindunsten 1.49 g eines farblosen Produkts. Man trennte mit 30 ccm siedendem Methanol von 0.09 g Natriumchlorid ab, dunstete erneut ein und behandelte den Rückstand mit wenig Wasser. Der dabei nicht gelöste Anteil (0.95 g) hatte einen Zers.-P. von 128° . Die Gesamtausbeute betrug 90%.

Die Substanz ist in Methanol leicht, in Wasser und Dioxan mäßig, in Äther und Essigester schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid gibt sie keine Farbreaktion. Im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Äthanol/Wasser 5:1) hat sie den gleichen R_F -Wert wie die Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5 \cdot \text{HCl}$. Zur Analyse fällte man aus Dioxan/Essigester um.

4.393 mg Substanz, 9.355 mg CO_2 , 2.440 mg H_2O
 3.158 mg Substanz, 0.167 ccm N_2 , (22° , 723 Torr)

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ (267.3)

Ber. C 58.37 H 6.41 N 5.24

Gef. C 58.12 H 6.22 N 5.82

Äthoxylbestimmung:

3.216 mg Substanz, 3.060 mg AgJ

Für $-\text{OC}_2\text{H}_5$: Ber. 16.85

Gef. 18.25

8.3 Reaktion der Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$

8.3a mit Diazomethan

Eine Suspension von 0.30 g (1.12 mMol) der Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ in 3 ccm Methanol wurde unter Kühlung (Eisbad) mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan umgesetzt. Nach Beendigung der lebhaften Reaktion engte man die gelbe Lösung ein und erhielt ein farbloses Öl (0.31 g; 98%), das dünn-schichtchromatographisch rein war (Laufmittel: Äthanol/Wasser 5:1).

Die Substanz ist in Methanol, Äthanol, Benzol und Äther leicht, in Wasser und Petroläther schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid tritt keine Farbreaktion auf.

3.041 mg Substanz, 6.655 mg CO_2 , 1.880 mg H_2O

4.344 mg Substanz, 0.195 ccm N_2 , (23°, 722 Torr)

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (281.3)

Ber. C 59.88 H 6.81 N 4.98

Gef. C 59.77 H 6.92 N 4.93

Alkoxybestimmung:

3.184 mg Substanz 5.340 mg AgJ

Für die Summe von $-\text{OC}_2\text{H}_5$ und $-\text{OCH}_3$ errechnen sich 5.315 mg AgJ.

Als man das Hydrochlorid $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5 \cdot \text{HCl}$ mit Diazomethan umsetzte, erhielt man ebenfalls die Verbindung $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (50%).

8.3b mit Benzoylchlorid

Man versetzte 0.27 g (1.00 mMol) der Verbindung $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ mit 1.00 ccm 1n Natronlauge und kühlte die blaßgelbe Lösung auf 0°. Unter Rühren und Kühlen wurden zu der Lösung in kleinen Anteilen und abwechselnd 0.60 g Benzoyl-

chlorid und 2.85 ccm 2n Natronlauge getropft. Nach Beendigung der Zugabe (75 Min.) versetzte man mit 30 ccm Wasser und mit 25 ccm Essigester. Man fügte 2n Salzsäure zu, bis pH 2 erreicht war, extrahierte dreimal mit Essigester und trocknete diese Fraktionen über Natriumsulfat. Das nach Eindunsten erhaltene blaßgelbe Kristallinat (0.76 g) wurde mit 5 ccm Äther behandelt. Die als unlöslicher Anteil verbliebene farblose, pulverige Substanz (0.12 g) zersetzte sich bei 170-178°. Weitere 0.16 g dieses Pulvers wurden erhalten, als man die ätherische Lösung mit Petroläther versetzte; die Gesamtausbeute betrug 75%. Wie ein Dünnschichtchromatogramm in Äthanol/Wasser (5:1) zeigte, war die Substanz rein.

Die Verbindung ist in Methanol, Äthanol, Aceton, Dioxan und Essigester leicht, in Äther mäßig, in Benzol, Chloroform und Petroläther schwer löslich. Mit Eisen(III)-chlorid tritt keine Farbreaktion auf.

Zur Analyse wurde aus Äthanol/Wasser umkristallisiert; dabei stieg der Zers.-P. auf 183-186°.

4.528 mg Substanz, 10.690 mg CO₂, 2.270 mg H₂O
2.811 mg Substanz, 0.100 ccm N₂, (24°, 720 Torr)

C₂₀H₂₁NO₆ (371.4)

Ber. C 64.65 H 5.69 N 3.77

Gef. C 64.44 H 5.61 N 3.88

Äthoxylbestimmung:

3.122 mg Substanz 2.030 mg AgJ

Für -OC₂H₅: Ber. 12.13

Gef. 12.48

Molekulargewichtsbestimmung: 352

Benzoylbestimmung:

3.291 mg Substanz

Für -COC₆H₅: Ber. 28.29

Gef. 28.06

Literaturverzeichnis

- (1) M. BERGMANN und L. ZERVAS
Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1192 (1932).
- (2) E. DANE, F. DREES, P. KONRAD und T. DOCKNER
Angew.Chem. 74 873 (1962).
- (3) P. KONRAD
Univ. München, Dissertation (1962).
- (4) F. DREES
Univ. München, Dissertation (1963).
- (5) T. DOCKNER
Univ. München, Dissertation (1964).
- (6) M. BERGMANN, L. ZERVAS und H. RINKE
Z.physiol.Chem. (Hoppe-Seyler) 224, 40 (1934).
- (7) A. KOSSEL und E.L. KENNAWAY
Z.physiol.Chem. (Hoppe-Seyler) 72, 486 (1911).
- (8) H. ZAHN und J.F. DIEHL
Angew.Chem. 69, 135 (1957).
- (9) K. HOFMANN, H. KAPPELER, A.E. FURLENMEIER, M.E. WOOLNER,
E.T. SCHWARTZ und T.A. THOMPSON
J.Am.Chem.Soc. 79, 1641 (1957).
- (10) K. HOFMANN, W.D. PECKHAM und A. RHEINER
J.Am.Chem.Soc. 78, 238 (1956).
- (11) H. van ORDEN und E.L. SMITH
J.Biol.Chem. 208, 751 (1954).
- (12) K. HOFMANN, A. RHEINER und W.D. PECKHAM
J.Am.Chem.Soc. 75, 6083 (1953).
- (13) C. BERSE und L. PICHE
J.Org.Chem. 21, 808 (1956).
- (14) K. FELIX und K. DIRR
Z.physiol.Chem. (Hoppe-Seyler) 176, 29 (1928).
- (15) H.T. CLARKE und H.B. GILLESPIE
J.Am.Chem.Soc. 54, 1964 (1932).
- (16) H.B. MILNE und C.H. PENG
J.Am.Chem.Soc. 79, 639 (1957).
- (17) D.T. GISH und F.H. CARPENTER
J.Am.Chem.Soc. 75, 950 (1953).
- (18) D.T. GISH und F.H. CARPENTER
J.Am.Chem.Soc. 75, 5872 (1953).

- (19) L. ZERVAS, M. WINITZ und J.P. GREENSTEIN
J.Org.Chem. 22, 1515 (1957).
- (20) L. ZERVAS, T. OTANI, M. WINITZ und J.P. GREENSTEIN
J.Am.Chem.Soc. 81, 2878 (1959).
- (21) G.W. ANDERSON J.Am.Chem.Soc. 75, 6081 (1953).
- (22) R.A. BOISSONNAS, S. GUTTMANN, J.-P. WALLER und
P.-A. JAQUENOUD Experientia 12, 446 (1956).
- (23) P.G. KATSOYANNIS J.Am.Chem.Soc. 79, 109 (1957).
- (24) V. du VIGNEAUD, D.T. GISH und P.G. KATSOYANNIS
J.Am.Chem.Soc. 76, 4751 (1954).
- (25) J.R. VAUGHAN und R.L. OSATO
J.Am.Chem.Soc. 73, 5553 (1951).
- (26) J.C. SHEEHAN und G.P. HESS
J.Am.Chem.Soc. 77, 1067 (1955).
- (27) J.R. VAUGHAN und R.L. OSATO,
J.Am.Chem.Soc. 74, 676 (1952).
R.A. BOISSONNAS, Helv.Chim.Acta, 34, 874 (1951).
T. WIELAND und H. BERNHARD
Ann. 572, 190 (1951).
- (28) A. PATCHORNIK, A. BERGER und E. KATCHALSKI
J.Am.Chem.Soc. 79, 6416 (1957).
- (29) M. BERGMANN und L. ZERVAS,
Z.physiol.Chem. (Hoppe-Seyler) 175, 145 (1928).
T. WIELAND und G. SCHNEIDER
Ann. 580, 159 (1953).
G.W. ANDERSON und R. PAUL
J.Am.Chem.Soc. 80, 4423 (1958).
- (30) V. du VIGNEAUD und O.K. BEHRENS
J.Biol.Chem. 117, 27 (1937).
- (31) L. ZERVAS und D.M. THEODOROPOULOS
J.Am.Chem.Soc. 78, 1359 (1956).
- (32) S. BÄUERLEIN Univ. München, Diplomarbeit (unveröffentl.).
- (33) K. OKAWA Bull.Chem.Soc. Japan 30, 976 (1957).
- (34) N.C. DAVIS J.Biol.Chem. 223, 935 (1956).

- (35) K. HOFMANN, A. JÖHL, A.E. FURLLENMEIER und H. KAPPELER,
J.Am.Chem.Soc. 79, 1636 (1957).
C.A. DEKKER, S.P. TAYLOR und J.S. FRUTON,
J.Biol.Chem. 180, 155 (1949).
- (36) R. SCHWYZER, B. ISELIN und M. FEURER
Helv.Chim.Acta 38, 69 (1955).
- (37) W. SCHRÖER Univ. München, Dissertation (1962).
- (38) R.M. HERBST und D. SHEMIN
Org.Syntheses, Coll. Volume II, 519.
- (39) H. SCHWARZ, F.M. BUMPUS und J.H. PAGE
J.Am.Chem.Soc. 77, 1522 (1955).
- (40) R.W. HOLLEY und E. SONDHEIMER
J.Am.Chem.Soc. 76, 1326 (1954).
- (41) G. CERESOLE Ber.dtsch.chem.Ges. 17, 812 (1884).
- (42) L. CLAISEN Ber.dtsch.chem.Ges. 59, 149 (1926).
- (43) H.E. CARTER, P. HANDLER und D.P. MELVILLE
J.Biol.Chem. 129, 359 (1939).
- (44) H. PESENECKER Univ. München, Dissertation (1960).
- (45) E. ABDERHALDEN und A. WEIL
Z.physiol.Chem. (Hoppe-Seyler) 77, 435 (1912).
- (46) K. v. AUWERS und STUHLMANN
Ber.dtsch.chem.Ges. 59, 1053 (1926).

Lebenslauf

Am 6. Mai 1938 wurde ich als Sohn des Patentanwalts Dr. Fritz Zumstein und seiner Ehefrau Lore, geb. Best, in Berlin geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschulen in Paretz b. Potsdam, Bad Dürkheim und München besuchte ich ab Herbst 1948 das Wittelsbacher Gymnasium in München, wo ich im Juli 1957 die Reifeprüfung ablegte. Ab Wintersemester 1957 studierte ich an der Universität München Chemie. Im Juli 1960 bestand ich hier die Diplom-Chemiker-Vorprüfung, im Januar 1963 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung. Von Januar 1963 bis Mai 1965 arbeitete ich an meiner Diplom- und Doktorarbeit im Laboratorium von Frau Prof. Dr. E. Dane im Institut für organische Chemie der Universität München.

